

# ORGANISCHE AMINOALKYLNITRATE

—

## EINE NEUE KLASSE NO-BASIERTER VASODILATATOREN



seit 1558

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

**Dipl.-Pharm. Carolin Juliane Roegler**

geboren am 02. Januar 1978

in Bonn

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jochen Lehmann, Jena
2. Prof. Dr. Erika Glusa, Jena
3. Prof. Dr. Hartmut Kleinert, Mainz

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.September 2010

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Oktober 2006 bis April 2010 am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

Großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Jochen Lehmann, der mich trotz meiner anfänglichen Bedenken von dem Thema überzeugte. Seine Anregungen waren immer wertvoll und mit seiner Art prägte er zudem die gute Arbeitsatmosphäre. Außerdem bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Erika Glusa sowie Herrn Prof. Hartmut Kleinert für ihre fachliche Unterstützung, ihre Anregungen und die stete Diskussionsbereitschaft.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit in gemeinsamen Projekten danke ich allen Kooperationspartnern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und werde an entsprechender Stelle auf sie verweisen.

Herzlich danken möchte ich auch allen Kollegen, die durch ihre unkomplizierte und nette Art zur guten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Durch die vielen gemeinsamen Erfahrungen und die unvergesslichen Dachterrassenabende wird mir die Zeit meiner Promotion in Jena in bester Erinnerung bleiben. Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle Claudia Lengfelder, mit der ich nicht nur den Arbeitsplatz, sondern auch die Wohnung teilen durfte, sowie Dr. Andreas König, der mir mit seiner Vorarbeit den Weg in dieses Thema geebnet hat. Franziska Müller und Ronny Ludewig danke ich für den gemeinsamen Kampf durch den Formatierungsdschungel.

Des Weiteren gilt mein Dank den technischen Mitarbeitern des Instituts. Im Speziellen Monika Listing und Katrin Fischer für die Nachsynthese meiner Substanzen sowie Uwe Beck dafür, jederzeit zur Stelle zu sein, wenn praktische Hilfe benötigt wurde. Inge Reich danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei formellen und organisatorischen Fragen.

Carsten Thomas und Micha Nehring danke ich sehr für das Korrekturlesen der Arbeit. Carsten Thomas zusätzlich für sein allzeit offenes Ohr und Verständnis auch in anstrengenden Phasen.

Mein größter und besonderer Dank gilt aber meiner Familie, in erster Linie meinen Eltern Dr. Manfred und Brigitte Roegler, für ihre immer währende Unterstützung, ihre Hilfe in allen erdenklichen Bereichen und ihr unerschütterliches Vertrauen in mich.





<b>A</b>	<b>ANGINA PECTORIS</b>	<b>1</b>
	<b>A.1 Pathogenese der Angina pectoris</b>	<b>1</b>
	A.1.1 Therapie der Angina pectoris	2
	<b>A.2 Geschichte und Anwendung der organischen Nitrate</b>	<b>3</b>
	A.2.1 Historischer Überblick	3
	A.2.2 Nitrovasodilatoren in der Praxis	6
	<b>A.3 Wirkung der organischen Nitrate</b>	<b>9</b>
	A.3.1 Pharmakodynamik der Nitrate	9
	A.3.2 Wirkmechanismus der Nitrovasodilatoren	10
	A.3.3 Bioaktivierung der organischen Nitrate	12
	A.3.4 Nitrattoleranz	17
	A.3.5 Regulierung der Genexpression durch organische Nitrate	21
<b>B</b>	<b>ZIELSTELLUNG</b>	<b>23</b>
	<b>B.1 Vorbemerkungen - Apparativer Aufbau</b>	<b>23</b>
	<b>B.2 Wissenschaftliche Problemstellungen</b>	<b>24</b>
<b>C</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>27</b>
	<b>Publikation 1</b>	<b>29</b>
	<b>NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator.</b>	
	König, Andreas; Roegler, Carolin; Lange, Kathrin; Daiber, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. <i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters</i> <b>2007</b> , 17, 5881-5.	
	<b>Publikation 2</b>	<b>37</b>
	<b>Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-Alzheimer drug candidates.</b>	
	Fang, Lei; Appenroth, Dorothea; Decker, Michael; Kiehntopf, Michael; Roegler, Carolin; Deufel, Thomas; Fleck, Christian; Peng, Sixun; Zhang, Yihua; Lehmann, Jochen. <i>Journal of Medicinal Chemistry</i> . <b>2008</b> , 51, 713-6.	

	<b>Publikation 3</b>	<b>43</b>
	<b>NO donors. Part 18: synthesis and vasorelaxant properties of the bioactive metabolites of GTN and PETN.</b>	
	Lange, Kathrin; König, Andreas; <u>Roegler, Carolin</u> ; Seeling, Andreas; Lehmann, Jochen. <i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters</i> <b>2009</b> , 19, 3141-4.	
	<b>Publikation 4</b>	<b>49</b>
	<b>A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena.</b>	
	Schuhmacher, Swenja; Schulz, Eberhard; Oelze, Matthias; König, Andreas; <u>Roegler, Carolin</u> ; Lange, Kathrin; Sydow, Luise; Kawamoto, Toshihiro; Wenzel, Philipp; Münzel, Thomas; Lehmann, Jochen; Daiber, Andreas. <i>British Journal of Pharmacology</i> <b>2009</b> , 158, 510-20.	
	<b>Publikation 5</b>	<b>63</b>
	<b>Medizinische Chemie der organischen Nitrate und PDE5-Hemmer</b>	
	<u>Roegler, Carolin</u> ; Lehmann, Jochen. <i>Pharmazie in unserer Zeit</i> <b>2010</b> , angenommen, erscheint Oktober 2010	
	<b>Publikation 6</b>	<b>73</b>
	<b>A novel class of nitrovasodilators – Potency and in-vitro tolerance of organic aminoalkylnitrates.</b>	
	<u>Roegler, Carolin</u> ; Koenig, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. <b>2010</b> , eingereicht am 28.6.2010	
<b>D</b>	<b>UNVERÖFFENTLICHTE ERGEBNISSE</b>	<b>91</b>
	<b>D.1 Nachhaltigkeits der Relaxation von Aminoalkylnitraten</b>	<b>91</b>
	<b>D.2 Vasoaktivität von NO-Donor-Statin-Hybridmolekülen</b>	<b>95</b>
	<b>D.3 Untersuchungen der Hämoxygenase-1-Expression</b>	<b>97</b>
	<b>D.4 Untersuchungen zur Bioaktivierung von Aminoalkylnitraten</b>	<b>101</b>
<b>E</b>	<b>GESAMTDISKUSSION</b>	<b>105</b>
	<b>E.1 Beeinflussung der Vasoaktivität durch das Trägermolekül</b>	<b>105</b>
	<b>E.2 Vasorelaxierende Eigenschaften der GTN- und PETN-Metaboliten</b>	<b>106</b>
	<b>E.3 Einfluss einer Aminogruppe im Trägermolekül auf die Vasoaktivität</b>	<b>107</b>
	<i>E.3.1 Synthese einer Serie unterschiedlicher Aminoalkylnitrate</i>	<i>107</i>
	<i>E.3.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen der organischen Aminoalkylnitrate</i>	<i>110</i>
	<b>E.4 Organische Aminoalkylnitrate - Eine neue Klasse von NO-Donoren</b>	<b>111</b>

---

<b>E.5</b>	<b>Vasoaktivität von Nitrat-Hybridverbindungen</b>	<b>115</b>
<b>F</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>117</b>
<b>G</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>121</b>
<b>H</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>125</b>
<b>I</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>127</b>
<b>J</b>	<b>ANHANG</b>	<b>I</b>
	<b>Curriculum vitae</b>	<b>I</b>
	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>II</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>IV</b>



## A Angina pectoris

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind in Deutschland schon seit vielen Jahren die häufigste Todesursache. Bei knapp der Hälfte aller Verstorbenen wird der Tod durch eine Herz-Kreislauf-Erkrankung verursacht, wobei dieser Anteil schon seit einigen Jahren konstant bleibt.<sup>1</sup> Zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen laut *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD) alle angeborenen und nicht durch Verletzung erworbenen Erkrankungen des Herzens, der Gefäße und des Kreislaufs. Hierunter fallen auch die ischämischen Herzkrankheiten, die in der Statistik der Todesursachen den größten Anteil ausmachen. Die ischämischen Herzkrankheiten beinhalten unter anderem die Angina pectoris und den akuten Myokardinfarkt.<sup>2</sup>

### A.1 Pathogenese der Angina pectoris

Die Angina pectoris („Brustenge“) gilt als Leitsymptom der koronaren Herzkrankheit. Hierbei liegt in nahezu allen Fällen eine arteriosklerotische Veränderung der Koronargefäße zugrunde. Es kommt zu Ablagerungen an den Gefäßwänden und somit zu einer Verengung des Gefäßlumens (Stenose). Die darauf folgende verminderte Durchblutung der Herzmuskelgefäße führt zu einem gesteigerten Sauerstoffbedarf des Herzens, der das vorhandene, verminderte Sauerstoffangebot überschreitet. Diese Diskrepanz wird als Ischämie bezeichnet.<sup>3</sup>

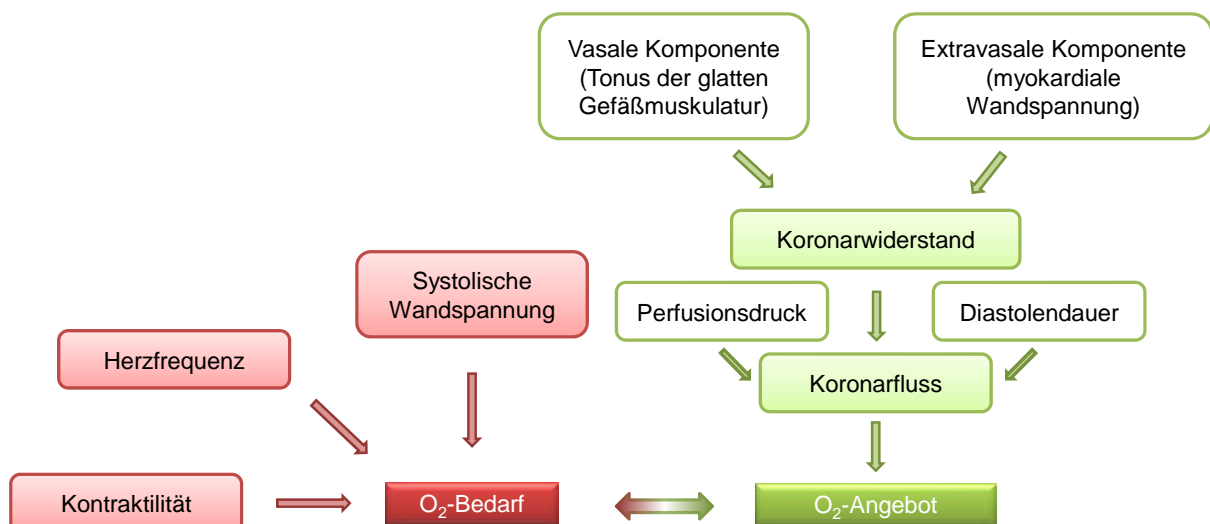


Abb. A-1: Regulierung des Sauerstoffbedarfs und -angebots am Herzen. modifiziert nach 4

Der Sauerstoffbedarf wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Er steigt bei erhöhter Herzfrequenz, gesteigerter Kontraktibilität des Herzmuskels sowie gesteigerter Nachlast,

welche sowohl vom Aortenblutdruck als auch vom Ventrikelfüllungsvolumen und somit der Wandspannung abhängt. Auch das Sauerstoffangebot wird durch unterschiedliche Größen bestimmt. Hier sind die Durchblutung der Koronararterien, der Strömungswiderstand in den Kapillaren, der Druckgradient zwischen Aorta und Koronararterien und die Vorlast maßgebliche Determinanten (*Abb. A-1*).

Wird durch eine arteriosklerotische Ablagerung die Durchblutung im Koronargefäß gestört, so versucht der Körper mit einer Erweiterung der Blutgefäße in diesem Areal gegenzusteuern. Es kommt zur Vasodilatation, um einen konstanten, ausreichenden Blutfluss zu gewährleisten.<sup>4;5</sup>

### **A.1.1 Therapie der Angina pectoris**

Die Therapie der Angina pectoris umfasst unterschiedliche Ansätze. Eine Verbesserung der Symptome, Reduzierung der Anfallshäufigkeit, Verhinderung weiterer kardialer Komplikationen (Herzinfarkt, instabile Angina) und damit verbunden natürlich eine Erhöhung der Lebenserwartung werden angestrebt. Grundsätzlich stehen anti-ischämisch wirksame und vasoprotektive Mittel zur Verfügung.<sup>4-7</sup>

#### ***Organische Nitrate***

Organische Nitrate sind immer noch die Mittel der ersten Wahl zur Behandlung eines akuten Angina pectoris-Anfalls. Ihre anti-ischämische Wirkung beruht auf verschiedenen Faktoren. Hauptsächlich wirken sie venenerweiternd, es kommt also zu einer Verminderung des diastolischen Füllungsvolumens und damit zu einer Vorlastsenkung (*siehe Abschnitt A.3.1*). Bei einer stabilen Angina pectoris führt Nitratgabe zu einer verbesserten Belastungstoleranz und späterem Einsetzen von anginösen Symptomen. Des Weiteren sind die Nitrate in der Lage, einen Koronarspasmus aufzuheben.

#### ***Calciumkanalblocker (Ca-Blocker)***

Calciumkanalblocker wirken aufgrund einer Verringerung des Calciumeinstroms durch die langsamen, spannungsabhängigen Calciumkanäle der Muskelzellen vasodilatierend. Diese Kanäle vom L-Typ finden sich hauptsächlich in der glatten Muskulatur und im Herzmuskel. Im Gegensatz zu den Nitraten wirken Ca-Blocker vor allem auf die großen Arterien und Widerstandgefäße, also auch auf die Koronararterien. Die Reduktion des Calciumionen-Einstroms führt sowohl zu einer Verminderung der Schlagfrequenz als auch der Schlagkraft. An der glatten Muskulatur der Gefäße kommt es zu einer Vasodilatation infolge des erniedrigten Gefäßmuskeltonus. Diese Effekte führen in Kombination mit einer durch den Blutdruckabfall bedingten Nachlastsenkung zu einem verringerten Sauerstoffbedarf am

Herzen. Auch Ca-Blocker können zur Anfallsprophylaxe eingesetzt werden. Durch die Erweiterung der Koronararterien sind sie zudem in der Lage, einen Koronarspasmus aufzuheben.

### ***β-Adrenorezeptor-Antagonisten (β-Blocker)***

Wie die organischen Nitrate und Ca-Blocker eignen sich auch die β-Blocker zur Therapie der Angina pectoris. Der antianginöse Effekt beruht auf einer Senkung des Sauerstoffbedarfs durch Blockade der β<sub>1</sub>-Rezeptoren. Dadurch wird das Herz vor erhöhter Sympathikus-Aktivierung geschützt, die Herzfrequenz herabgesetzt sowie die Kontraktilität reduziert. Als Folge kommt es zu einem verringerten Sauerstoffbedarf des Herzens. Wegen des größeren linksventrikulären enddiastolischen Volumens nimmt zwar auch die Vorlast zu, dies wirkt sich jedoch durch die verlängerte Dauer der Diastole und dem damit verbundenem vermehrten koronaren Blutfluss sowie erhöhtem Sauerstoffangebot nicht nachteilig aus.

### ***Ivabradin***

Neu auf dem Gebiet der Angina pectoris Behandlung ist die bradykardisierende Substanz Ivabradin (Abb. A-2). Dieses blockiert selektiv die I<sub>f</sub>-Kanäle im Sinusknoten, dem Schrittmacher des Herzens, und erniedrigt auf diesem Weg die Herzfrequenz und infolgedessen den Sauerstoffbedarf des Herzens. Es erhöht die Belastbarkeit und verringert das Auftreten von Anfällen ähnlich gut wie β-Blocker. Daher wird es hauptsächlich bei mangelnder Wirksamkeit oder Unverträglichkeit gegenüber β-Blockern eingesetzt.

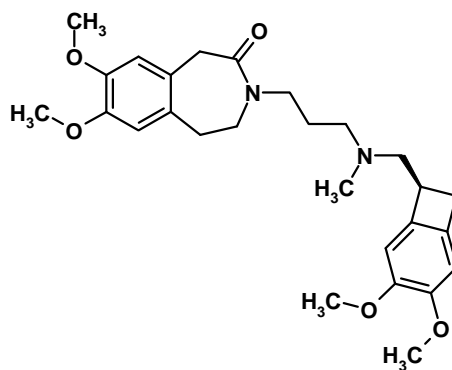


Abb. A-2: Strukturformel von Ivabradin

## **A.2 Geschichte und Anwendung der organischen Nitrate**

### **A.2.1 Historischer Überblick**

Die Geschichte der therapeutischen organischen Nitrate begann 1847 mit der Entdeckung von Glyceroltrinitrat (GTN) durch Ascanio Sobrero. Nachdem er erfolgreich Mannitolhexanitrat hergestellt hatte, bewerkstelligte er bald darauf auch die bedeutende Synthese von Glyceroltrinitrat.<sup>8</sup> Sobrero führte mit der neuen Substanz einen organoleptischen Test durch und stellte fest, dass selbst eine für ihn scheinbar sehr kleine Menge in starken Kopfschmerzen resultierte. Auch war sich Sobrero des Gefahrenpotentials

der von ihm „Pyroglycerin“ genannten, hochexplosiven Substanz bewusst, für eine praktische Anwendung hielt er sie für zu gefährlich.<sup>9</sup>

Zur gleichen Zeit stellte der englische Chemiker Frederick Guthrie fest, dass es nach der Inhalation von Amylnitrit schon binnen einer knappen Minute zu einem Pulsieren im Nacken kommt, dem ein erhöhter Blutstrom in Nacken, Schläfen und Stirn folgt, sowie zu einem beschleunigten Herzschlag. Er postulierte ebenfalls die kurze Wirkdauer von nur etwa einer Minute.<sup>10</sup> Zwei Ärzte, Benjamin Richardson in London und Arthur Gamgee in Edinburgh, fanden in Tierversuchen heraus, dass Amylnitritgabe zu einer Senkung des Blutdrucks führt. Basierend auf diesen Erkenntnissen war es Lauder Brunton, ein schottischer Mediziner, der das Nitrit erstmals an einem an Angina pectoris erkrankten Patienten erfolgreich testete. Auch beobachtete er, dass nach einiger Zeit eine Dosiserhöhung zum Erreichen des gleichen Effektes notwendig war. Heute ist dieses Phänomen als Nitrattoleranz bekannt.<sup>11;12</sup> Auf der Suche nach länger wirksamen Mitteln stieß er auf die Arbeit des Homöopathen Constantin Hering. Dieser wollte, nach dem homöopathischen Prinzip *similia similibus curantur* (Ähnliches wird durch Ähnliches geheilt), mit GTN Kopfschmerzen bekämpfen. Bereits kurz nach der Entdeckung durch Sobrero war er auf die neue Substanz aufmerksam geworden. Durch die Anwendung an gesunden Patienten, die eine Wirksamkeit des „Glonoins“, wie Hering GTN benannte, beweisen sollten, konnte er bereits etliche Wirkungen und Nebenwirkungen definieren.<sup>13;14</sup>

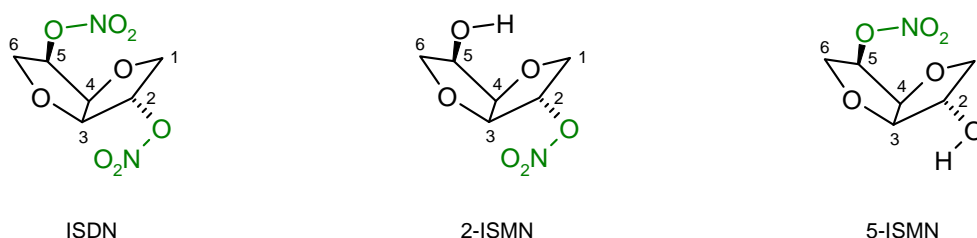
Den Weg von der Homöopathie in die Schulmedizin fand GTN dann endgültig 1858, als der nicht homöopathisch orientierte Arzt Alfred Field es bei einer 68-jährigen Frau mit starken Brustschmerzen einsetzte.<sup>15</sup> Auch Brunton hatte Untersuchungen mit GTN durchgeführt, war aber aufgrund der auftretenden Kopfschmerzen skeptisch gegenüber der Anwendung an Patienten.<sup>16</sup> William Murell setzte schließlich GTN 1878 bei Angina pectoris-Patienten ein. Er fand in einer Studie mit 35 gesunden Patienten heraus, dass es im Vergleich zu Amylnitrit eine längere Wirkdauer hat. Daraufhin testete er die Substanz an vier Angina pectoris-Patienten. Durch deren Berichte gelangte er zu dem heute noch gültigen Ergebnis, dass es sinnvoller ist, das Medikament zu Beginn eines akuten Anfalls zu applizieren als es regelmäßig dreimal täglich einzunehmen.<sup>17</sup> Ein befreundeter Chemiker, William Martindale, fand eine stabile und transportable Möglichkeit, indem er GTN in Schokolade verarbeitete, was zudem den Vorteil hatte, dass jeder Patient seine individuelle Dosierung durch Variation der Stückgröße selbst bestimmen konnte.<sup>15</sup> Damit war die sublinguale Anwendung geboren. Schon kurze Zeit später kamen GTN-Pillen von unterschiedlichen Herstellern in unterschiedlichen Stärken auf den Markt.<sup>18</sup>

Ende der 1930er Jahre beschäftigten sich dann Krantz und seine Arbeitsgruppe mit der Synthese verschiedener Zuckeralkohole sowie deren Anhydriden. Das eigentliche Ziel war



es hierbei, Substanzen als Energiequellen für den Körper zu entwickeln, die unabhängig von Insulin verstoffwechselt werden konnten. Anders als erwartet kam es aber zu keinerlei Metabolisierung der Zuckeralkoholanhydride, sie wurden nahezu unverändert wieder ausgeschieden.<sup>19-21</sup> In der gleichen Arbeitsgruppe wurde ebenfalls auf dem Gebiet der Nitrit- und Nitrates ter geforscht. Amylnitrit, zu dieser Zeit neben GTN Standard in der Angina pectoris-Therapie, hatte den Nachteil, dass es explosiv und flüchtig war und zudem während der Anwendung noch einen unangenehmen, süßlich-dumpfen Geruch freisetzte. *Krantz et al.* kamen zu dem Schluss, dass eine weniger flüchtige Substanz das Wirkungsspektrum verbessern würde. Die Kombination beider Forschungsansätze führte schließlich zur Entdeckung der Nitrates ter der Zuckeralkoholanhydride. In einer Studie mit sieben unterschiedlichen Nitraten wurde deutlich, dass es durch die Etherbrücke in den Anhydriden zwar zu einer abgeschwächten, dafür aber auch zu einer verlängerten Wirkung kommt.<sup>22</sup> Weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf Isomanniddinitrat (IMDN) und Isosorbiddinitrat (ISDN), die aufgrund ihrer Hydrolysestabilität die vielversprechendsten Eigenschaften hinsichtlich Wirkstärke und -dauer hatten. In einem ersten Vergleich beider Substanzen kam Goldberg zu dem Schluss, dass ISDN durch seine höhere Aktivität sowie längere Wirkdauer besser für eine Therapie der Angina pectoris geeignet sei.<sup>23</sup> Es folgten Anfang der 1960er Jahre etliche Studien mit ISDN, in denen die pharmakologischen Eigenschaften sowie die Anwendung getestet wurden.<sup>24-27</sup> ISDN etablierte sich auf dem Markt und wurde wie noch heute sowohl oral als auch sublingual angewendet.

Nachdem Needleman und Krantz 1965 zeigen konnten, dass GTN zu 1,2- und 1,3-Glyceroldinitrat metabolisiert wird,<sup>28</sup> folgten weitere Untersuchungen des Metabolismus organischer Nitrates.<sup>29;30</sup> Wieder waren es *Needleman et al.*, die herausfanden, dass ISDN zu einem wesentlich größeren Anteil zu Isosorbid-5-mononitrat (5-ISMN) als zu Isosorbid-2-mononitrat (2-ISMN) metabolisiert wird (*Abb. A-3*).<sup>31</sup> Später wurde klar, dass der an Position 5 nitrierte Metabolit hauptsächlich für das Wirkspektrum des ISDN verantwortlich ist. Dies erklärt ebenfalls, warum für ISDN und 5-ISMN ein ähnliches Dosierungsschema gilt.<sup>32</sup>



*Abb. A-3: Räumliche Strukturen von ISDN und seinen bioaktiven Metaboliten 2-ISMN und 5-ISMN*

Auch Pentaerythritoltetranitrat (PETN), das erstmalig schon Anfang des 20. Jahrhunderts synthetisiert worden war, wurde in dieser Zeit vermehrt auf seine antianginöse Wirkung

untersucht. In diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass es sich bei PETN um ein länger wirksames Nitrat handelt, das im Gegensatz zu GTN schon prophylaktisch zur Verhinderung akuter Angina pectoris-Anfälle verabreicht werden kann. Allerdings wurde auch konstatiert, dass zu einer Kupierung einer akuten Attacke weiterhin GTN von Nöten sei. Des Weiteren fiel damals schon das nebenwirkungsarme Profil des PETN auf.<sup>33;34</sup>

Mitte des 20. Jahrhunderts schlossen sich viele Arbeiten zur Pharmakologie verschiedener organischer Nitrate an. Eine Vielzahl von Substanzen, darunter sowohl halogenierte als auch unhalogenierte, zyklische und aliphatische Derivate, wurde synthetisiert und getestet, manche gelangten zeitweise auf den Markt, verschwanden allerdings auch schnell wieder.<sup>35</sup> Bei einer dieser Substanzen handelt es sich um das organische Aminoalkylnitrat Triethanolamintrinitrat (TEAN). Entwickelt 1940 von Junkmann, kam es Ende der 1940er Jahre als *Nitrotabletten Schering*<sup>®</sup> auf den Markt. Bei ersten pharmakologischen Untersuchungen ergab sich eine verbesserte Koronardurchblutung,<sup>36</sup> die sich in weiterführenden Studien am isolierten Kaninchenherz bestätigte.<sup>37</sup> Die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen waren jedoch nicht einheitlich. Zwar wurde einerseits in einer Studie mit 26 Patienten eine Verbesserung der Symptome nachgewiesen,<sup>38</sup> andererseits konnte in einer weiteren Studie mit 21 Patienten kein signifikant besserer Effekt nach der Einnahme gezeigt werden. Allerdings schnitt auch ein damals verwendetes, langsam freisetzendes GTN-Präparat (*Nitroglyn*<sup>®</sup>) schlecht ab, während PETN als einziger hier untersuchter langwirksamer Koronardilatator als einsetzbar beurteilt wurde.<sup>39</sup> In einer später durchgeführten Arbeit mit sechs unterschiedlichen Nitraten konnte ein positiver Effekt des TEAN nicht bestätigt werden, da es zudem einige Nebenwirkungen aufwies.<sup>40</sup> Auch noch Jahre später, als sich das Medikament weiterhin auf dem Markt befand, konnte seine therapeutische Relevanz nicht belegt werden und möglicherweise sind Studien wie diese der Grund, dass es heute obsolet ist.<sup>41</sup>

### A.2.2 Nitrovasodilatoren in der Praxis

Zu den in der klinischen Praxis eingesetzten Nitrovasodilatoren gehören die im Folgenden dargestellten Verbindungen (*Abb. A-4*).

#### ***Glyceroltrinitrat (GTN)***

Der hauptsächliche Einsatzbereich für GTN liegt nach wie vor in der Therapie der Angina pectoris. Zur Unterbrechung eines akuten pectanginösen Anfalls sowie zur Behandlung des akuten Myokardinfarkts, akuter Linksherzinsuffizienz und katheterinduzierten Koronarspasmen wird es als Spray und als Zerbeißkapsel eingesetzt (z. B. *Nitrolingual*<sup>®</sup>, *Nitrangin*<sup>®</sup>). Zur Prophylaxe und Langzeitbehandlung steht es als transdermales

therapeutisches System mit kontrollierter Freisetzung zur Verfügung (z. B. *Nitroderm*<sup>®</sup>). Außerdem wird es zur Therapie der vasospastischen und instabilen Angina und bei hypertensiver Krise auch intravenös verabreicht (z. B. *perlinganit*<sup>®</sup>, *Trinitrosan*<sup>®</sup>). In geringer Menge kann es ebenfalls zur Schmerzlinderung bei Analfissuren eingesetzt werden (*Rectogesic*<sup>®</sup>).

Neueren Untersuchungen zufolge hat es zudem eine positive Wirkung beispielsweise bei der Anwendung gegen Osteoporose, Phlebitis oder frühzeitigen Wehen.<sup>42-44</sup>

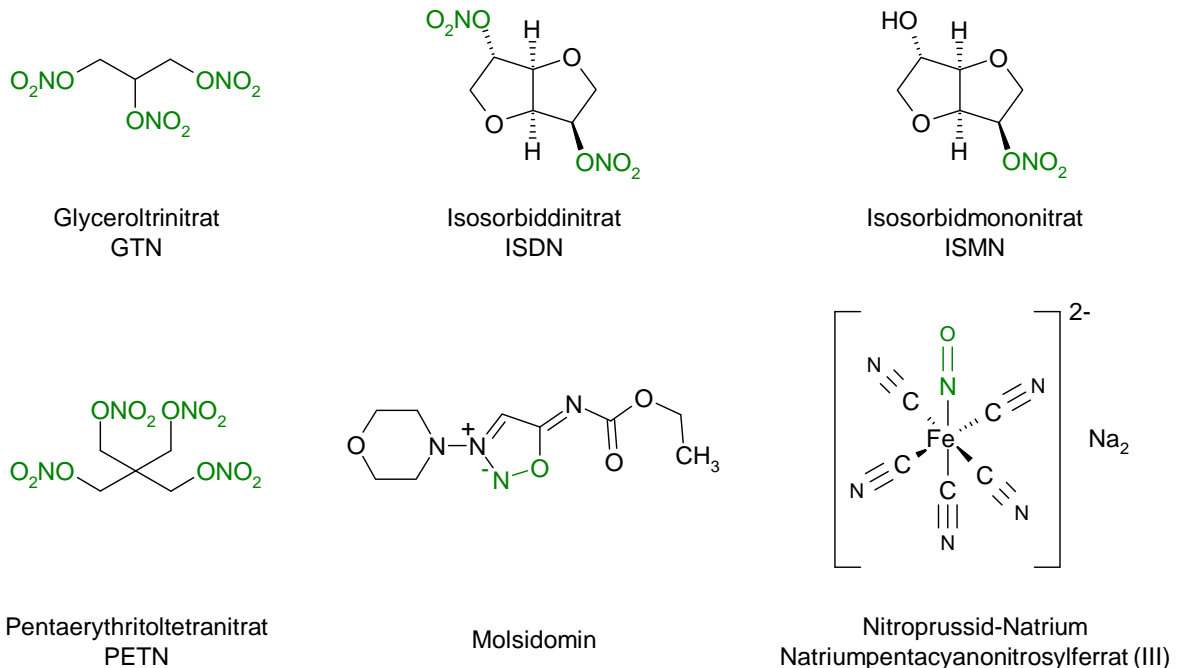


Abb. A-4: Überblick über die klinisch verwendeten Nitrovasodilatoren.

### **Isosorbiddinitrat (ISDN)**

ISDN eignet sich sowohl zur Langzeittherapie als auch zur Behandlung des akuten Angina pectoris-Anfalls. Es ist als Tabletten in retardierter (Langzeittherapie) und nicht retardierter Form (Akutbehandlung) sowie als Spray im Handel (z. B. *isoket*<sup>®</sup>, *Diconpin*<sup>®</sup>, *Jenacard*<sup>®</sup>). Die Tabletten können darüber hinaus auch als vorbeugende Maßnahme bei bevorstehender körperlicher Belastung eingenommen werden.

Wie auch von GTN existiert ebenfalls eine Infusionslösung zur Therapie der instabilen Angina pectoris und akuten Linksherzinsuffizienz sowie Salbe zur transdermalen Anwendung (*isoket*<sup>®</sup>).

***Isosorbidmononitrat (ISMN)***

Bei ISMN entfällt der Einsatz als Anfallstherapeutikum, da im Vergleich zu ISDN der Wirkungseintritt des Mononitrats eher langsam ist. Neben der Anwendung zur Langzeittherapie ist es außerdem für den Einsatz bei chronischer Herzinsuffizienz in Kombination mit anderen herzwirksamen Mitteln wie Herzglykosiden, Diuretika oder ACE-Hemmern zugelassen (z. B. *MONIT-PUREN*<sup>®</sup>, *ismo*<sup>®</sup>).

***Pentaerythritoltetranitrat (PETN)***

Der langwirksame Vasodilatator PETN eignet sich hervorragend zur Langzeittherapie der Angina pectoris. Da es als einziges verwendetes organisches Nitrat auch bei Langzeitanwendung keine Toleranzphänomene hervorruft, kann es ohne nitratfreies Intervall eingesetzt werden (*Pentalong*<sup>®</sup>, *Nirason*<sup>®</sup>).

***Molsidomin***

Molsidomin gehört zur Gruppe der Sydnonimine, die NO ohne Beteiligung von Enzymen freisetzen (*Abb. A-5*). Zwar wird Molsidomin in der Leber durch Esterasen zu seinem aktiven Metaboliten SIN-1 bzw. Linsidomin umgewandelt, der Ringzerfall erfolgt jedoch unabhängig von Enzymen. Erste Studien deuteten darauf hin, dass sich durch diese nicht-enzymatische Freisetzung keine Toleranz entwickelt, jedoch konnte später gezeigt werden, dass auch die Wirkung des Molsidomins mit dauerhafter Applikation schwächer wird.<sup>45</sup> Es handelt sich um einen langwirksamen NO-Donor, der nicht im Akutfall eingesetzt werden kann. Obwohl Molsidomin bei Angina pectoris ursprünglich nur dann zur Anwendung kommen sollte, wenn andere Arzneimittel nicht angezeigt sind oder versagen, liegt die Verordnungshäufigkeit mittlerweile sogar über der des ISDN.<sup>46</sup> Auf dem Markt befindet sich Molsidomin hauptsächlich in Form von Retardtabletten (z. B. *Corvaton*<sup>®</sup>, *Molsihexal*<sup>®</sup>), außerdem sind nicht retardierte Zubereitungen sowie Injektionslösungen als Präparate zugelassen.

***Nitroprussid-Natrium***

Der NO-Donor Nitroprussid-Natrium setzt in vaskulärem Gewebe durch Reduktion NO frei. Da bei diesem Zerfall auch Cyanid-Ionen und damit auch Blausäure entstehen können, wird gleichzeitig Thiosulfat, welches Cyanid in ungefährliches Thiocyanat überführt, als Antidot verabreicht.<sup>47</sup> Nitroprussid-Natrium wird nur in der Intensivmedizin bei akuten hypertensiven Krisen als Infusion eingesetzt (*nipruss*<sup>®</sup>). Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit kann der Blutdruck so schnell und genau eingestellt werden.

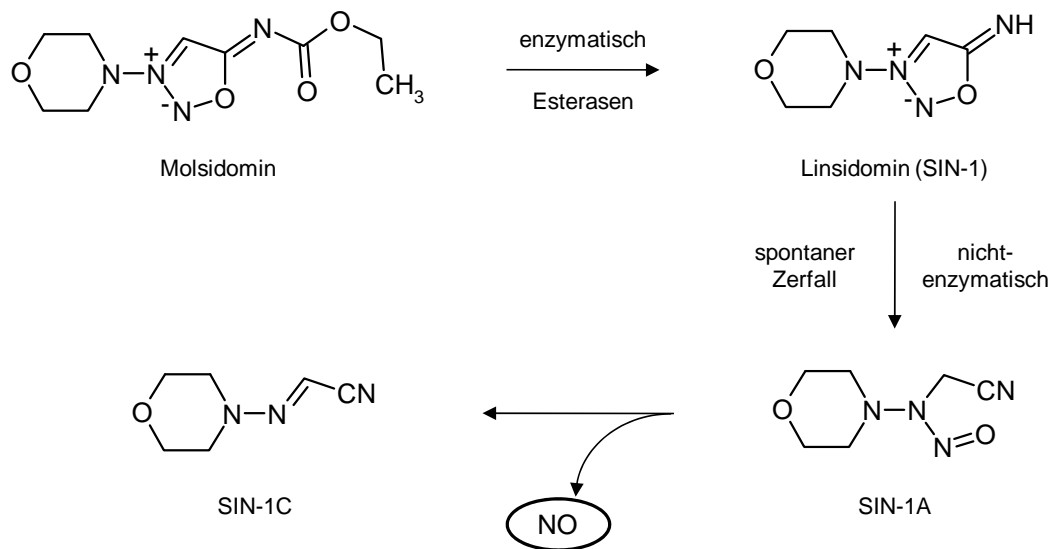


Abb. A-5: Biotransformation von Molsidomin. Nach der enzymatischen Spaltung in der Leber kommt es durch spontanen Zerfall des aktiven Metaboliten Linsidomin (SIN-1A) zur Entstehung des inaktiven Metaboliten SIN-1C sowie Stickstoffmonoxid.

### A.3 Wirkung der organischen Nitrate

#### A.3.1 Pharmakodynamik der Nitrate

Wie bereits in *Abschnitt A.1.1* erwähnt, greifen organische Nitrate in geringen Dosierungen an der Venenmuskulatur an. Zudem erweitern sie die großen konduktiven Gefäße, einschließlich der großen koronaren Kollateralgefäße. Durch die dilatierende Wirkung auf die Kapazitätsgefäße kommt es zum „venous pooling“, also zu einer vermehrten Blutaufnahme im venösen Teil des Gefäßsystems. Die daraus resultierende Vorlastsenkung hinsichtlich des diastolischen Ansaugvorgangs und die Erniedrigung der intramyokardialen Wandspannung beeinflussen die Angina pectoris positiv. Der Sauerstoffbedarf des Herzens wird gesenkt, während durch die Verminderung der extravasalen Komponente des Koronarwiderstandes gleichzeitig die endokardiale Durchblutung verbessert wird. Die Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Druckes erhöht den koronaren Perfusionsdruck. Bei geringen Konzentrationen kommt es nicht zu einer arteriellen Dilatation, so dass ein „coronary steal“ verhindert wird. Im ischämischen Areal wird durch den erhöhten Perfusionsdruck die Durchblutung sogar verbessert.

Im Bereich einer Stenose wird durch Dilatation großer Koronargefäße eine verbesserte Durchblutung erreicht. Des Weiteren wird nicht nur an der Stenose, sondern auch in Bereichen geschädigten Endothels eine dilatierende Wirkung erreicht. Dies ist besonders zweckmäßig, da es dort zu einer vermehrten Freisetzung vasokonstriktorisch wirkender

Substanzen aus Thrombozyten kommt. Neben dem gefäßerweiternden Effekt wirken organische Nitrate, Molsidomin und Nitroprussid-Na antiaggregatorisch und besitzen so zusätzlich einen prophylaktischen Effekt hinsichtlich einer Thrombusbildung.

### **A.3.2 Wirkmechanismus der Nitrovasodilatoren**

#### ***Entdeckung von NO***

Obwohl organische Nitrate schon seit Ende des 19. Jahrhunderts in der Therapie eingesetzt wurden, war der exakte Wirkmechanismus fast hundert Jahre unbekannt. Der Pharmakologe Ferid Murad und seine Mitarbeiter studierten in den 1970er Jahren die Wirkung unterschiedlicher Vasodilatoren einschließlich GTN und fanden heraus, dass sowohl GTN als auch Nitroprussid-Natrium und gasförmiges NO in der Lage sind, die lösliche Guanylylcyclase zu stimulieren und so eine Vasorelaxation auszulösen.<sup>48</sup> Unabhängig davon beobachteten Robert Furchgott und John Zawadzki, dass Acetylcholin (ACh) trotz seiner großen vasodilatatorischen Wirkstärke *in vitro* in Einzelfällen keine Relaxation auslösen konnte. Nach eingehender Untersuchung fanden sie heraus, dass dieses Phänomen auf eine unbeabsichtigte Beschädigung oder Entfernung des Endothels zurückgeführt werden konnte.<sup>49</sup> In weiterführenden Studien postulierten sie, dass die instabile vasodilatierende Substanz aus dem Endothel, die zu einer Gefäßerweiterung nach Gabe von Bradykinin, Histamin, ADP und ATP führt, ein und dieselbe ist und nannten sie „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF).

Zwei Arbeitsgruppen identifizierten 1986 nahezu gleichzeitig EDRF als NO. Louis Ignarro war bei einem Symposium auf die Ähnlichkeit zwischen EDRF und NO aufmerksam geworden.<sup>50</sup> In einer Reihe von vergleichenden Experimenten, unter anderem durch Hemmung der Relaxation mit Oxyhämoglobin, Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (sGC) sowie Verbesserung des dilatierenden Effektes durch Superoxiddismutase (SOD), zeigte er, dass es sich bei EDRF nur um NO oder eine verwandte Spezies handeln konnte.<sup>51</sup> Sogar schon ein paar Monate früher war Salvador Moncada in ähnlichen Experimenten mit Hämoglobin und SOD zum gleichen Ergebnis gekommen.<sup>52</sup>

Wie wichtig die Entdeckung des kleinsten endogen gebildeten Moleküls war, wurde 1998 durch die Verleihung des Nobelpreises an Furchgott, Ignarro und Murad unterstrichen.<sup>53;54</sup>

#### ***Mechanismus der Vasodilatation***

Die Vermittlung einer Vasodilatation läuft im Körper über einen mehrstufigen Prozess ab (Abb. A-7). Aus der Aminosäure L-Arginin wird unter Verbrauch von NADPH und O<sub>2</sub> endogen Stickstoffmonoxid und L-Citrullin gebildet (Abb. A-6). Diese oxidative Umsetzung des N-

terminalen Guanidinstickstoffs mit Sauerstoff wird durch die Familie der NO-Synthasen (NOS) katalysiert.<sup>55</sup> Es sind drei unterschiedliche Isoformen der NOS bekannt, die sich in der Reihenfolge ihrer Entdeckung und Klonierung in NOSI (früher nNOS = neuronale Form) NOSII (früher iNOS = induzierbare Form) und NOSIII (früher eNOS = endotheliale Form) einteilen lassen. Sowohl die NOSI als auch die NOSIII werden ständig gebildet und werden daher auch als konstitutive NOS zusammengefasst, während die NOSII gewebspezifisch nach Stimulation von beispielsweise Entzündungsmediatoren oder Endotoxinen exprimiert wird.<sup>56</sup> Die im Endothel lokalisierte, für die Gefäßerweiterung verantwortliche NOSIII bindet in Gegenwart erhöhter Konzentrationen von Calciumionen an Calmodulin und wird so durch die Bildung eines Calcium-Calmodulin-NOS-Komplexes aktiviert.<sup>57</sup>

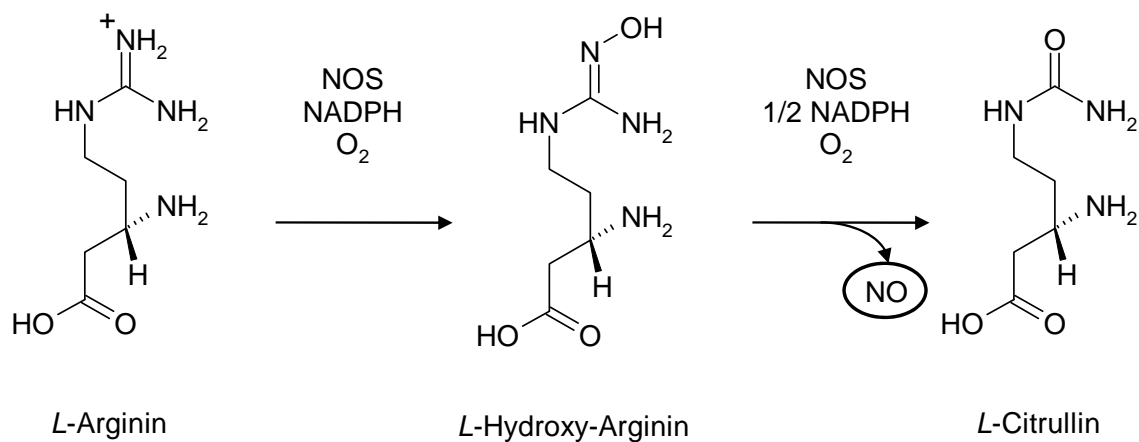


Abb. A-6: Endogene NO-Synthese aus L-Arginin

Das aus L-Arginin entstandene NO aktiviert daraufhin die intrazelluläre lösliche Guanylylcyclase (sGC).<sup>58</sup> Dieses Enzym ist ein aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehendes Heterodimer, wobei die  $\beta$ -Einheit die Häm-bindende Domäne enthält.<sup>59</sup> Durch die Bindung von NO an das Eisen der prosthetischen Häm-Gruppe kommt es zu einer Konformationsänderung des Eisenkomplexes und daraufhin zu einer starken Aktivierung der sGC.<sup>60</sup> Die Guanylylcyclase katalysiert die Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Letzteres fungiert dann wiederum als second messenger und aktiviert anschließend cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK-I). Die Proteinkinasen setzen eine Signalkaskade in Gang, die durch Phosphorylierung verschiedener Zielproteine letztendlich in einer Erniedrigung der intrazellulären Calciumkonzentration resultiert. Außerdem kommt es zu einer Verminderung der Empfindlichkeit von Calcium-abhängigen, vasokonstriktorisch wirkenden Proteinen.<sup>61</sup>

Eine Hemmung der NO-sensitiven sGC z. B. mittels des spezifischen Inhibitors 1*H*-[1,2,4]Oxadiol[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-on (ODQ) schwächt die Nitrat-vermittelte Vasodilatation ab.<sup>62</sup> Eine Erhöhung der cGMP-Konzentration durch Hemmung der abbauenden

Phosphodiesterasen (PDE) hingegen verstärkt sie.<sup>63</sup> Nitrovasodilatoren wirken folglich über denselben oben beschriebenen Signalweg. Im Gegensatz zu Molsidomin bzw. dessen aktivem Metaboliten SIN-1 und Nitroprussid-Natrium, die beide nicht-enzymatisch NO freisetzen, ist allerdings der exakte Prozess der Bioaktivierung genauso wie das aktive Wirkprinzip der organischen Nitrate auf molekularer Ebene immer noch unklar.

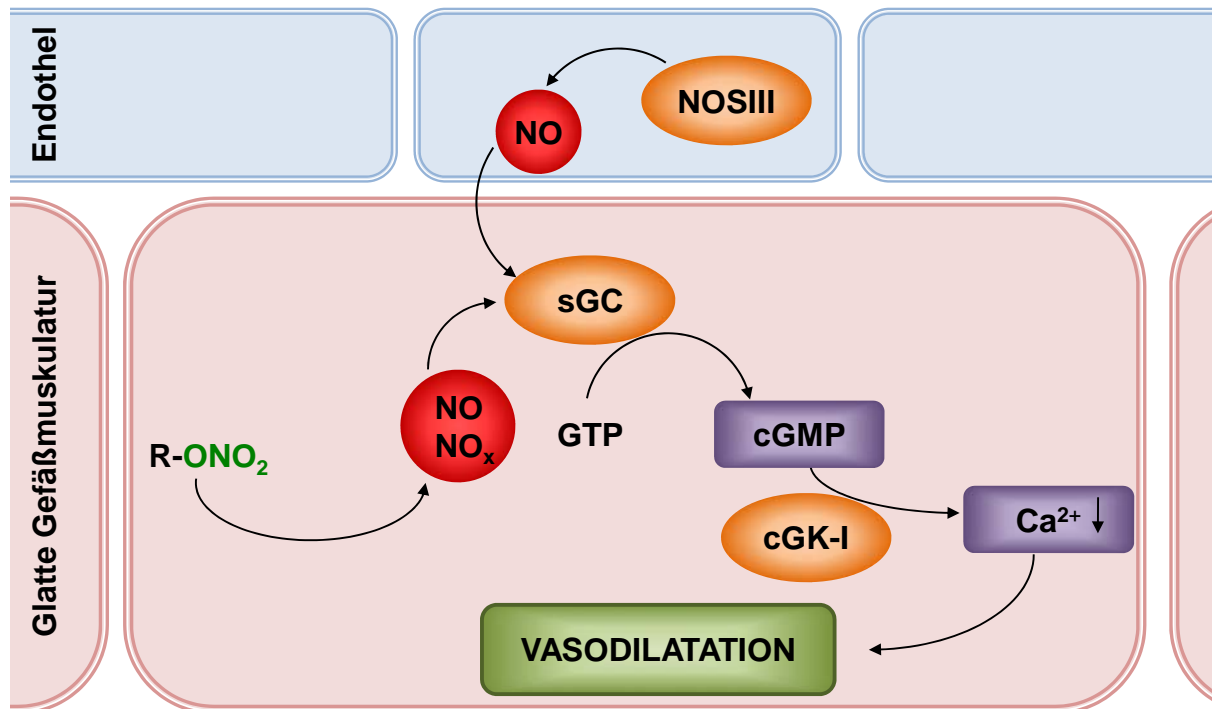


Abb. A-7: Zellulärer Mechanismus der Vasodilatation. Nach der Umsetzung der organischen Nitrate ( $R\text{-ONO}_2$ ) in der glatten Gefäßmuskulatur zu Stickstoffmonoxid (NO) oder verwandten Spezies ( $\text{NO}_x$ ) wird die mehrstufige Signalkaskade gestartet. Über den gleichen Weg wirkt auch endogen gebildetes NO. Endotheliale NO-Synthase (NOSIII), Lösliche Guanylylcyclase (sGC) Guanosintriphosphat (GTP), cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP), cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK-I)

### A.3.3 Bioaktivierung der organischen Nitrate

Es gilt als gesichert, dass es unterschiedliche Biotransformationswege gibt, die entweder zum Abbau oder zur Bioaktivierung der Nitrate führen. Beim Abbau von Glyceroltrinitrat entsteht durch die Umsetzung mit Glutathionreduktase und Glutathion-S-Transferase vorwiegend anorganisches Nitrit und Nitrat sowie 1,3-Glyceroldinitrat (1,3-GDN).<sup>64</sup> In vaskulärem Gewebe kommt es hingegen zur regioselektiven Verstoffwechselung von GTN zu 1,2-Glyceroldinitrat (1,2-GDN).<sup>65</sup> Aus Untersuchungen mit verschiedenen Thiolen ergab sich, dass deren Reaktion mit GTN zu den Produkten 1,3-GDN und Nitrit nur Clearance-basiert ist, nicht aber zur Bioaktivierung führt.<sup>66</sup>



Eine Ausnahme bildet das Thiol Cystein und einige seiner Derivate wie z. B. *N*-Acetylcystein. In ersten Studien zeigte sich eine verstärkte Aktivierung der sGC durch GTN in Anwesenheit von Cystein,<sup>67</sup> eine daran beteiligte NO-Freisetzung wurde später jedoch angezweifelt. Zum einen konnten nur Mengen von NO nachgewiesen werden, die für eine sGC-Aktivierung unzureichend waren,<sup>68</sup> zum anderen ließ sich keine Bildung des Nitrosyl-Häm-sGC-Komplexes nach Behandlung mit GTN/Cystein beobachten.<sup>69</sup> *Gorren et al.* fanden 2005 jedoch heraus, dass in dieser Studie durch den großen Überschuss an sGC der aktivierte Enzymkomplex einfach nicht mit der verwendeten spektroskopischen Methode detektiert werden konnte.<sup>70</sup> Nicht erklärt werden kann allerdings, warum nicht ebenfalls *L*-Cystein enthaltende Proteine wie beispielweise Glutathion GTN bioaktivieren können. Es ist daher fraglich, inwieweit dieser nicht-enzymatische Mechanismus *in vivo* eine Rolle spielt.

### **Vermittlung der GTN-Wirkung**

Aufgrund der Identifizierung von EDRF als NO hielt sich lange die Theorie, dass es sich bei dem aktiven Wirkprinzip der organischen Nitrate ebenfalls um Stickstoffmonoxid handelt. In unterschiedlichen Studien wurde tatsächlich in verschiedenen Zellen und Geweben die Entstehung von NO nachgewiesen. Die applizierten Nitratgaben lagen allerdings weit über den klinisch relevanten Konzentrationen.<sup>71-73</sup> Darüber hinaus scheiterten zwei Laboratorien in dem Bestreben, aus geringeren Dosen von GTN eine Bildung von freiem NO zu belegen.<sup>74;75</sup> Zuerst wurde von *Kleschyov et al.* mittels NO-Spintrapping und Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie die NO-Freisetzung anhand der Nitrosylierung von Eisen(II)-diethyldithiocarbamat ( $\text{Fe}[\text{DECT}]_2$ ) ermittelt und mit der Bildung von cGMP verglichen, das indirekt über den Nachweis von phosphoryliertem Vasodilator-stimuliertem Protein (P-VASP) bestimmt wurde.<sup>74</sup> Bei VASP handelt es sich um ein Substrat der cGK-I und somit um einen Marker der Proteinkinase-Aktivität.<sup>76</sup> Im Gegensatz zum Calciumionophor A23187 und ISDN wurde bei der Behandlung der Gefäße mit GTN ein enormer Unterschied (3 Zehnerpotenzen) zwischen der Zunahme an NO- $\text{Fe}[\text{DECT}]_2$  (Maß für die NO-Entstehung) und der Zunahme von P-VASP (Maß für die Vasodilatation) festgestellt. Die Vermutung lag nahe, dass unterschiedliche Wege der Bioaktivierung von Nitraten existieren. Diese Möglichkeit wurde durch die Befunde von *Nuñez et al.* unterstützt. Auch hier wurde mittels einer hoch empfindlichen Methode versucht, die NO-Entstehung mit der Vasoaktivität zu korrelieren.<sup>75</sup> Mit einem neuartigen NO-sensitiven Farbstoff konnte die NO-Freisetzung nach Inkubation mit verschiedenen NO-Donoren und GTN durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden. Im Gegensatz zu den anderen, nicht-enzymatisch freisetzenden, getesteten Substanzen (DETA-NO, SNAP, SIN-1) gab es für GTN keinen Anstieg des NO-Signals.

### **Stoffwechselweg über ALDH-2**

Viele verschiedene Enzyme wurden bereits für die Bioaktivierung von GTN diskutiert, darunter Glutathion-S-Transferase, Cytochrom-P450, Cytochrom-P450-Reduktase oder Xanthinoxidoreduktase. Zwar wurden alle, meist mit Hilfe von unspezifischen Inhibitoren, auf eine Metabolisierung von GTN untersucht, aber keine der Studien konnte die Aktivität von GTN zufriedenstellend erklären.<sup>77</sup>

*Chen et al.* gelang es schließlich, für die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) eine Nitrat-reduzierende Wirkung nachzuweisen. Nach Inkubation des isolierten Enzyms entstehen 1,2-GDN und anorganisches Nitrit, außerdem kommt es zur Bildung von cGMP und zur Vasodilatation.<sup>78</sup> In darauf folgenden *in vivo* Untersuchungen in ALDH-2 knockout Mäusen konnte, allerdings nur bei geringen Dosierungen, eine signifikante Abschwächung der GTN-Wirkung gezeigt werden. Hier wurde schon deutlich, dass es möglicherweise zwei unterschiedliche, von der applizierten Dosis abhängige Aktivierungswege für GTN gibt.<sup>79</sup> Dass nicht nur GTN, sondern auch andere Nitrate durch die ALDH-2 aktiviert werden, wurde 2004 von *Daiber et al.* in einer Studie mit PETN und weiteren Nitraten geklärt.<sup>80</sup> Sie kamen außerdem zu dem Ergebnis, dass nur sogenannte hochpotente Nitrate wie PETN, PETriN<sup>a</sup> und GTN in therapeutischen Dosierungen durch die ALDH-2 aktiviert werden. Vergleichsweise schwach wirksame Substanzen wie ISDN, PEdiN<sup>a</sup>, ISMN und PEMonoN<sup>a</sup> werden dagegen unabhängig von der ALDH-2 metabolisiert, vermutlich auf einem ähnlichen Weg wie die hochpotenten Nitrate, wenn sie in hohen Dosierungen verabreicht werden. Vorinkubation der Gefäße mit dem ALDH-Blocker Benomyl führte zwar zu einer Rechtsverschiebung der Relaxationskurve, aber dennoch nicht zu einem kompletten Verlust der vasoaktiven Potenz. Mit hohen Konzentrationen an GTN konnte immer noch eine maximale Vasodilatation erreicht werden.<sup>81</sup>

Die aktuell gültige Hypothese geht folglich davon aus, dass für Nitratester zwei unterschiedliche Aktivierungswege existieren. Einer für hochpotente Nitrate in therapeutischen Dosierungen, der über ALDH-2 vermittelt wird und ein anderer, ALDH-unabhängiger, der für niedrigpotente Nitrate bzw. hochpotente Nitrate in hohen Dosierungen gilt (*Abb. A-8*). Bestätigt wird diese Hypothese dadurch, dass sowohl durch den ALDH-2-Inhibitor Disulfiram als auch in Studien mit Asiaten, die eine Mutation des ALDH-2-Gens besitzen, die Antwort auf GTN vermindert war.<sup>82;83</sup>

Nach wie vor ungeklärt ist der Schritt vom anorganischen Nitrit zur Aktivierung der sGC. Die GTN-abhängige Stimulation der sGC findet nur in Anwesenheit von Mitochondrien statt und wird durch ALDH-Inhibitoren gehemmt. Außerdem wird dieser Effekt durch Hämoglobin und

---

<sup>a</sup> Bioaktiver Metabolit des PETN

Superoxid, beides NO-bindende Substanzen, abgeschwächt. Diese Tatsache weist wiederum auf eine Beteiligung von NO hin. Der molekulare Mechanismus ist jedoch weiterhin schwer greifbar.<sup>84</sup>

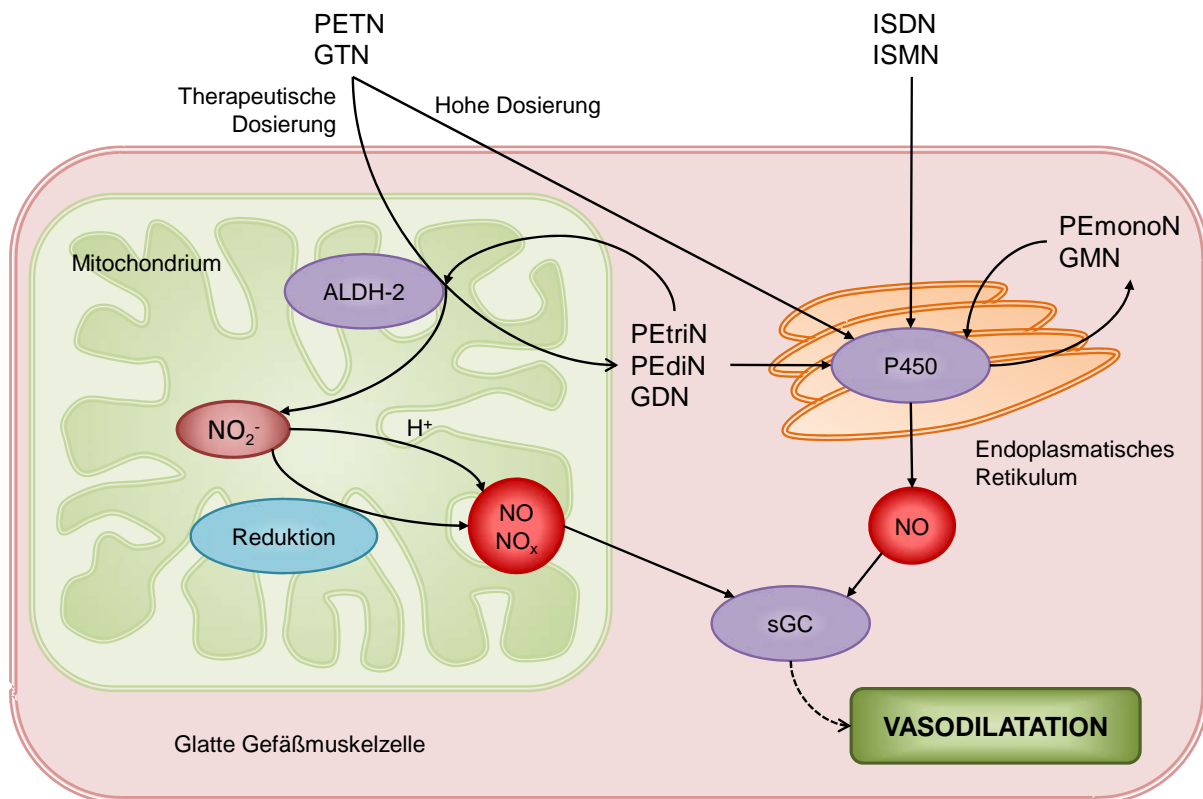


Abb. A-8: Bioaktivierung der organischen Nitratsalze. Die hochpotenten Nitratsalze PETN und GTN werden in therapeutisch relevanten Dosierungen über die ALDH-2 verstoffwechselt. Hierbei entstehen Nitrit sowie weitere bioaktive Metaboliten (PETriN, PEdiN und 1,2-GDN). PETriN wird ebenfalls durch ALDH-2 aktiviert, während PEdiN und GDN wie die niedrigpotenten Nitratsalze im endoplasmatischen Retikulum direkt zu NO verstoffwechselt werden. In den Mitochondrien entstandenes Nitrit wird durch Reduktion oder saure Disproportionierung zu NO bzw.  $\text{NO}_x$  umgewandelt. Lösliche Guanylylcyclase (sGC), Cytochrom-P450-Enzyme (P450).<sup>nach 85</sup>

Wenn durch ALDH-Katalyse gebildetes, anorganisches Nitrit zu einer sGC-stimulierenden Spezies transformiert wird, muss irgendwann eine Reduktion von Oxidationsstufe +3 zu Oxidationsstufe +2 stattfinden. Erste Vermutungen gingen von der intermediären Bildung von S-Nitrosothiolen aus, die wiederum in einer Redoxreaktion spontan NO freisetzen können.<sup>86</sup> Als mögliche enzymatische Vermittler der weiteren Reduktion kommen aber auch andere, ganz unterschiedliche Enzyme in Frage. Xanthinoxidoreduktase ist in der Lage, *in vitro* unter anaeroben Bedingungen Salpetersäureester zu NO zu reduzieren.<sup>87</sup> Sowohl Desoxyhämoglobin als auch Desoxymyoglobin können ebenfalls als Nitritreduktase fungieren und so zur Vasodilatation unter hypoxischen Bedingungen beitragen.<sup>88;89</sup> Zuletzt wurden auch verschiedene Enzyme der mitochondrialen Atemkette als Mediatoren diskutiert. In Frage kämen dafür der Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex sowie die Cytochrom-c-Oxidase.<sup>90;91</sup> Auch

eine Disproportionierung von salpetriger Säure nach Protonierung des Nitrits wurde in Betracht gezogen,<sup>78</sup> ist aber aufgrund der langsamen Reaktionsgeschwindigkeit unwahrscheinlich.<sup>92</sup>

Bisher konnte allerdings keine dieser Hypothesen der NO-Freisetzung aus klinisch relevanten Konzentrationen von GTN experimentell überzeugend bestätigt werden.

### Regulierung der ALDH-2

Die beiden klassischen Reaktionen, die von der ALDH-2 katalysiert werden, sind die Dehydrogenase-Aktivität und die Esterase-Aktivität (Abb. A-9). Die Dehydrogenierung spielt eine entscheidende Rolle für die Entgiftung von Acetaldehyd während des Ethanol-Abbaus. Das Substrat wird hierbei am Cystein302-Rest im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden. Es bildet sich zuerst ein Thiohemiacetal, das unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  zum Thioester oxidiert und schließlich zur Carbonsäure hydrolysiert wird. Auch bei der Esterhydrolyse entstehen nach nukleophilem Angriff am Cystein und anschließender Hydrolyse die Carbonsäure und der Alkohol. Im Gegensatz zur Aldehydoxidation findet die Esterhydrolyse allerdings ohne Beteiligung von  $\text{NAD}^+$  statt.<sup>93</sup>

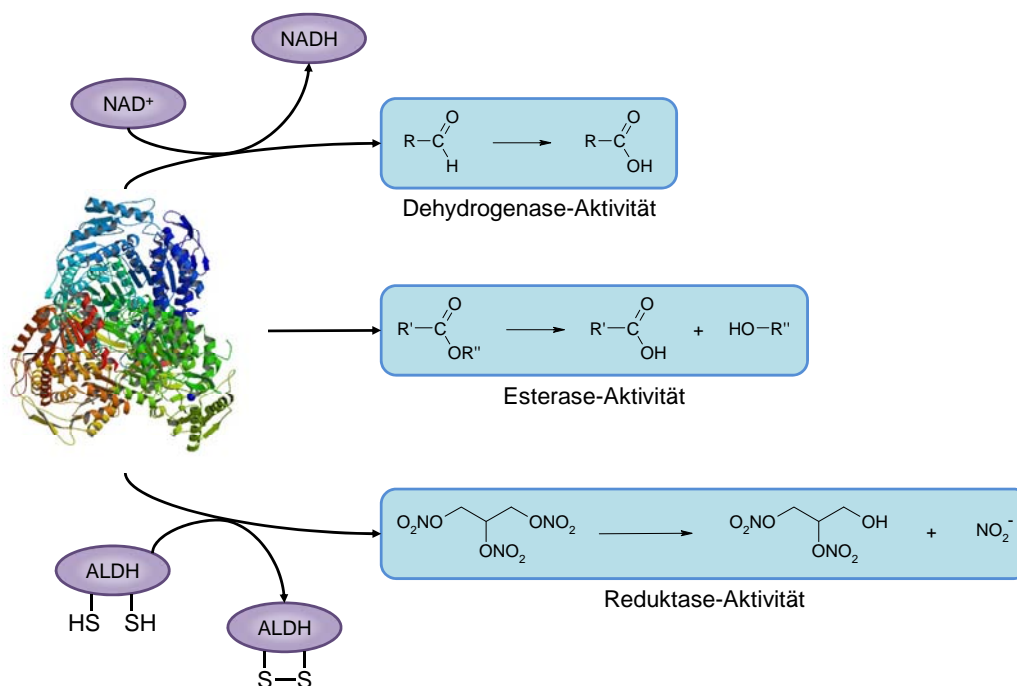


Abb. A-9: Kristallstruktur der humanen ALDH-2<sup>94</sup> (links) und deren Enzym-Aktivitäten (rechts). Unter Beteiligung von  $\text{NAD}^+$  werden Aldehyde zu den entsprechenden Carbonsäuren oxidiert. Als Esterase spaltet die ALDH-2 Carbonsäureester zur freien Säure und Alkohol. Bei der Reduktion von organischen Nitraten entsteht Nitrit und ebenfalls der entsprechende Alkohol. Hierbei wird das Enzym selber durch Oxidation inaktiviert.

Die Katalyse der Abspaltung des Nitratrestes ist die Kombination einer Esterhydrolyse mit einer gleichzeitigen Reduktion der Nitratfunktion. Der initiale Schritt besteht abermals im

Angriff des Substrats am Cys302 unter Bildung eines Thionitratkomplexes und Abspaltung von 1,2-GDN. Durch einen der benachbarten Cysteinreste im Enzym wird danach ein Disulfid gebildet und Nitrit abgespalten.<sup>95</sup> Das auf diese Weise durch Oxidation inaktivierte Enzym muss anschließend wieder durch Reduktion aktiviert werden. Bereits 1994 zeigten *Mukerjee et al.*, dass 2-Mercaptoethanol die Inaktivierung der ALDH nach ISDN-Gabe aufheben kann und vermuteten daraufhin eine Beteiligung von Sulfhydrylgruppen.<sup>96</sup> In späteren Untersuchungen wurde auch Dithiothreitol (DTT) als reaktivierende Substanz identifiziert, Glutathion jedoch war nicht in der Lage, die Oxidation rückgängig zu machen.<sup>78;97</sup> Neuen Studien zufolge ist die mitochondriale Dihydroliponsäure ein wahrscheinlicher Kandidat zur Erneuerung der ALDH-Funktion.<sup>97;98</sup> Die Abhängigkeit der GTN-Aktivierung von Thiolgruppen sowie eine Beteiligung der Mitochondrien wurde schon 1966 von Needleman vorgeschlagen.<sup>99</sup> Mit den neu vorliegenden Erkenntnissen rückte seine „Thioltheorie“ wieder in den Fokus.

### **Stoffwechselweg der schwach wirksamen Substanzen**

Niedrigpotente Nitrate werden im Unterschied zu den hochpotenten nicht über die ALDH-2 bioaktiviert (*siehe Abb. A-8*). Bei Untersuchungen an diesen Nitraten konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Stickstoffmonoxid detektiert werden, daher wird NO hier als aktives Wirkprinzip angesehen.<sup>73;74</sup>

Eine wie oben beschriebene nicht-enzymatische Umsetzung mit Thiolen scheint nicht in Frage zu kommen, da diese erst bei sehr hohen Konzentrationen stattfindet.<sup>100</sup> Eine Vielzahl von Studien konzentrierte sich auf die Cytochrom-P450-Enzyme (CYP450). Sowohl in der Leber als auch in den Koronargefäßen konnte aus ISDN eine Freisetzung von NO nachgewiesen werden.<sup>101;102</sup> Die beiden Isoformen CYP3A4 und CYP1A2 zeigten in humanem und tierischem Gewebe die größten Aktivitäten bei der Bildung von NO nach Applikation von GTN.<sup>102;103</sup>

### **A.3.4 Nitrattoleranz**

Das Phänomen der Nitrattoleranz beschreibt die reduzierte Reaktion der Gefäße bei wiederholter Einwirkung organischer Nitrate. Sie äußert sich in einer verminderten Vasodilatation sowie einer abgeschwächten blutdrucksenkenden Wirkung bei mehrmaliger Gabe der Substanzen.

Unter dem Begriff Nitrattoleranz werden unterschiedliche Aspekte zusammengefasst. Bei der sogenannten Pseudotoleranz handelt es sich um neurohumorale Gegenregulationen des Körpers. Durch den GTN-vermittelten Blutdruckabfall kommt es zur Auslösung eines

Baroreflexes und somit zu einer Stimulation vasokonstriktorisch wirkender Faktoren. Es folgen ein Anstieg der Katecholaminausschüttung und eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Dies resultiert in einer Zunahme der Konzentrationen an Vasopressin und Angiotensin II, sowie in einem erhöhten zirkulierenden Volumen. Die Gesamtheit dieser Einflüsse führt schließlich zu einem Blutdruckanstieg.<sup>104</sup> Pseudotoleranz kann auch in Zusammenhang mit allen anderen Arten der Toleranz auftreten.

*In vitro* tritt außerdem ein Phänomen auf, das als Folge von kurzzeitiger Applikation hoher Dosierungen zu einem akuten Wirksamkeitsverlust führt. Die *in vitro* Toleranz oder auch Tachyphylaxie lässt sich interessanterweise durch viele Antioxidantien wie z. B. Ascorbinsäure oder Superoxiddismutase (SOD) aufheben.<sup>105</sup> Tachyphylaxie wird deswegen häufig mit einer Erschöpfung an Thiolgruppen als Reduktionsmittel oder der Entstehung oxidativen Stresses in Verbindung gebracht.<sup>106</sup> Da sich mittels Untersuchungen der *in vitro* Toleranz Charakteristiken der Struktur-Wirkungs- oder Struktur-Toleranzbeziehungen bestimmen lassen, werden sie in der Pharmakologie häufig angewendet. Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zur Nitrattoleranz sind *ex vivo* Untersuchungen der Tachyphylaxie an isolierten Arterien.

Die sogenannte Kreuztoleranz steht eng mit der vaskulären Nitrattoleranz in Zusammenhang. Hier wird ein Wirkungsverlust eines NO-Donors gegenüber anderen Nitrovasodilatoren und Endothel-abhängigen Vasodilatoren, also endogenem NO, beobachtet. Gibt es eine abgeschwächte Antwort auf Endothel-abhängige Substanzen wie z. B. Acetylcholin, wird die Kreuztoleranz auch als endotheliale Dysfunktion (ED) bezeichnet. Dieser Begriff wird ebenfalls übergeordnet für pathophysiologische Veränderungen und als Marker für vaskuläre Komplikationen bei Bluthochdruck, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus verwendet.<sup>104</sup>

### **Vaskuläre Toleranz**

Der vaskulären oder auch klassischen Toleranz wird eine Vielzahl von Ursachen zugeschrieben, die voneinander nur schwer zu trennen sind (*Abb. A-10*). Hierzu gehören die Erschöpfung von Thiolgruppen, eine verminderte Bioaktivierung, Beeinträchtigung unterschiedlicher Enzyme, die in den GTN-Metabolismus involviert sind (sGC, cGMP, Phosphodiesterasen), oxidativer Stress, endotheliale Dysfunktion sowie eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Vasokonstriktoren.<sup>77;85</sup>

Die erste Theorie zur vaskulären Toleranz wurde bereits 1973 von Needleman aufgestellt. Er vertrat die These, dass die Interaktion der Sulfhydrylgruppen in einem Nitratrezeptor und den organischen Nitraten mit dem Ziel einer reduktiven Bioaktivierung eine entscheidende Rolle

in der Toleranzentwicklung spielt. Auch vermutete er, dass es in der Folge zur Bildung von Disulfidbrücken kommt, die daraufhin nicht mehr in der Lage sind, mit dem organischen Nitrat zu reagieren, während eine Relaxation mit anderen vasodilatierenden Substanzen (Papaverin, Nitroprussid-Na, cAMP) noch möglich ist.<sup>107</sup>

Später publizierten *Münzel et al.* einen anderen Mechanismus zur Ausbildung von Toleranz, der sich hauptsächlich auf die Entstehung oxidativen Stresses durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) stützt.<sup>108</sup> Sie entdeckten, dass das Entfernen des Endothels in toleranten Gefäßen wieder zu einer verbesserten Vasodilatation gegenüber GTN und SIN-1 führt und belegten somit einen direkten Einfluss des Endothels auf die Toleranzentwicklung. Zusätzlich zeigten sie, dass sich die gegenüber der Kontrolle erhöhten Superoxidkonzentrationen in tolerantem Gewebe durch Entfernen des Endothels wieder normalisieren lassen. Als Folge dieser erhöhten Superoxidbildung verschlechtert sich die NO-Verfügbarkeit durch Entstehung von Peroxinitrit.<sup>109</sup> Außerdem kommt es zur Beeinträchtigung des NO/cGMP-Signalweges.<sup>110</sup> In derselben Arbeitsgruppe wurden auch die Mitochondrien später als Hauptquelle des oxidativen Stresses identifiziert.<sup>80;81</sup> Die Vermutung lag nahe, dass die Peroxinitritbildung über eine Oxidation von Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) zu einer Entkopplung der NOSIII führt. Aufgrund der Entkopplung der enzymatischen Reduktion des Sauerstoffs von der katalytischen Reaktion mit *L*-Arginin ist die Synthese von NO aus *L*-Arginin nicht mehr möglich. Die NO-Freisetzung wird daraufhin durch eine Freisetzung von Superoxid ersetzt, was den oxidativen Stress im Gewebe weiter erhöht. Dies hat eine Schädigung des Gefäßes zur Folge und erklärt somit die verschlechterte Antwort auf ACh.<sup>111</sup> Ein weiterer Faktor, der zur Entstehung von oxidativem Stress und somit der endothelialen Dysfunktion beitragen könnte, ist die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der NADPH-Oxidase. Durch aktivierte PKC kommt es einerseits mittels Phosphorylierung der NOSIII zur Hemmung der NO-Synthese und andererseits zur Stimulation der NADPH-Oxidasen, was wiederum eine erhöhte Superoxidbildung zur Folge hat. Das Ergebnis ist ein durch GTN ausgelöster Teufelskreis aus Aktivierung der PKC, erhöhter ROS-Produktion, Verarmung an BH<sub>4</sub> und Entkopplung der NOSIII. Zusätzliche Mechanismen, die alle über Modulierungen von Enzymfunktionen wirken, sind die Inhibition der sGC durch ROS, Verminderung der cGK-I Aktivität (gemessen an der Abnahme von P-VASP) und Stimulation der PDEs.

Nach der Identifikation der mitochondrialen ALDH-2 als GTN-biotransformierendes Enzym in Kombination mit den Mitochondrien als Quelle des oxidativen Stresses konnte ein neuer Zusammenhang in der Toleranzentwicklung erkannt werden. Die redoxempfindliche ALDH-2 kann durch ROS zum Disulfid oxidiert und somit inaktiviert werden. Unterstrichen wurde diese Hypothese durch Studien an Mäusen, die eine partielle Defizienz an Mangan-

Superoxiddismutase (Mn-SOD) aufweisen. Dieses Enzym schützt durch die Katalyse des Superoxidabbaus vor Entkopplung der mitochondrialen Atemkette. Die Tiere selbst zeigten bereits vor der Behandlung erhöhten oxidativen Stress, nach der Gabe von GTN kam es außerdem zu einer vermehrten Bildung von ROS. Zusätzlich konnte eine Prädisposition für Tachyphylaxie und Kreuztoleranz gegenüber ACh sowie eine verschlechterte NO/cGMP-Signalwirkung (anhand von vermindertem P-VASP) festgestellt werden. Entscheidend war aber die Erkenntnis, dass es als Folge dieser Prozesse zu einer Inaktivierung der ALDH-2-Funktionen durch Auslastung der Reduktionskapazität kommt.<sup>112</sup>

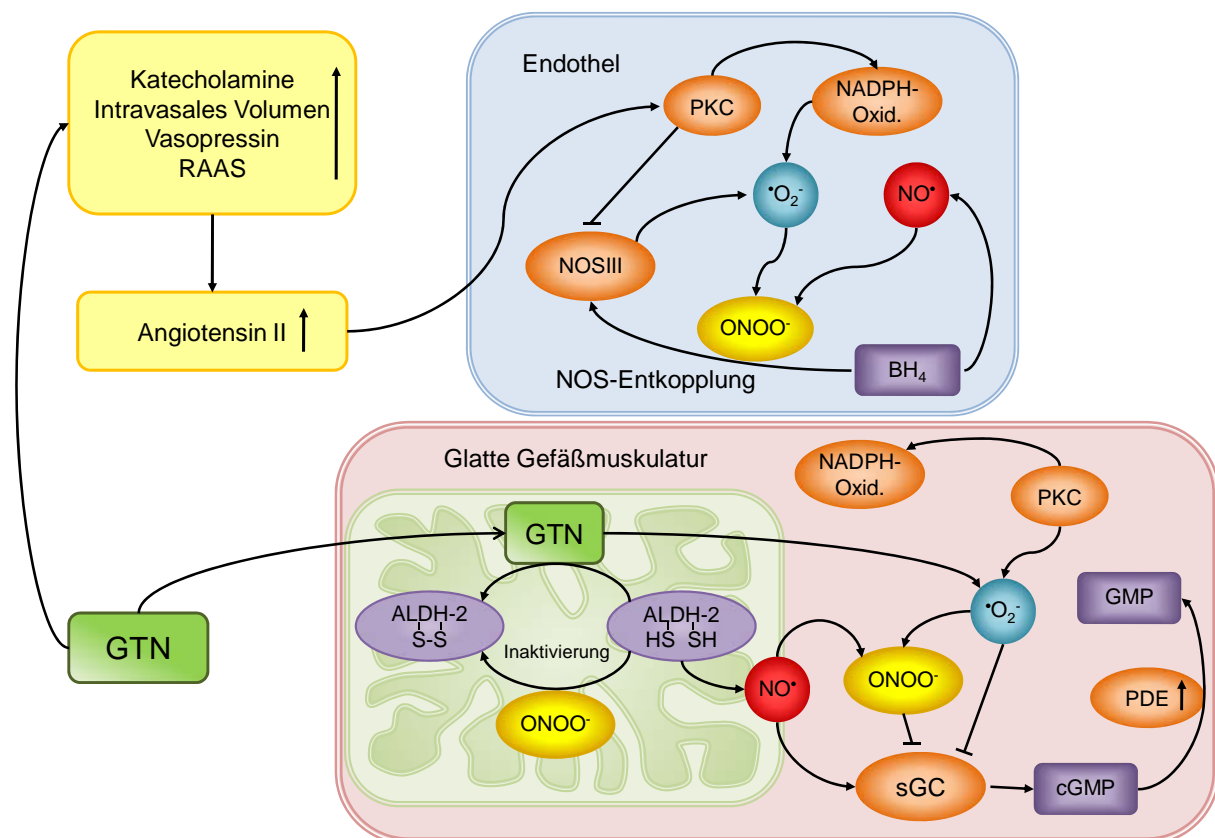


Abb. A-10: Mechanismen der Toleranzentwicklung am Beispiel von GTN. Zu Beginn einer GTN-Behandlung kommt es mittels neurohumoraler Gegenregulation zu einer Pseudotoleranz durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAAS) und Erhöhung des intravasalen Volumens sowie der Katecholamin-, Vasopressin- und Angiotensin II-Spiegel. Zur vaskulären und Kreuztoleranz führen nach etwa 3 Tagen die folgenden Mechanismen: 1. erhöhte Superoxid-Bildung ( $\cdot O_2^-$ ) im Endothel und der glatten Gefäßmuskulatur 2. Inhibition der NOS durch Proteinkinase C (PKC) 3. Entkopplung der NOS durch Bildung von Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) und dadurch verursachter Oxidation von Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ) 4. Inaktivierung der ALDH-2 durch Peroxynitrit und dadurch verminderte Bioaktivierung von GTN 5. Inhibition der sGC durch Superoxid und Peroxynitrit 6. Erhöhter cGMP-Abbau durch die hochregulierten Phosphodiesterasen (PDE). vereinfacht nach 4;85

### Sonderstellung des PETN

Wie bereits in Kapitel A.3.3. beschrieben, wird PETN wie GTN durch die ALDH-2 bioaktiviert. Nach einer *in vitro* Inkubation von Mitochondrien zeigt PETN genau wie GTN eine Bildung



reaktiver Sauerstoffspezies und eine Inhibition der ALDH-2, wenngleich in geringerem Maße.<sup>80</sup> Klinisch führt es aber bei chronischer Therapie weder zu einer Toleranzentwicklung noch zu einer endothelialen Dysfunktion.<sup>113;114</sup> Erste *in vitro* Untersuchungen ergaben, dass PETN in der Lage ist, die Hämoxxygenase-1 (HO-1) zu induzieren.<sup>115</sup> Die HO-1 ist ein Häm-abbauendes Enzym, dessen Abbauprodukte Eisen, Biliverdin und das vasodilatierend wirkende Kohlenmonoxid sind. Als Folge steigen ebenfalls die Spiegel von Ferritin- und Bilirubin, die beide antioxidativ wirksam sind.<sup>116</sup> Alle diese Faktoren wirken der Bildung von oxidativem Stress entgegen. Auch *in vivo* Studien konnten diese Befunde bestätigen. Durch GTN, aber nicht durch PETN, entwickelte sich eine Toleranz und oxidativer Stress. Außerdem wurde im Gegensatz zu GTN bei einer PETN-Behandlung nur eine minimale Veränderung der ALDH-2-Aktivität hervorgerufen. Durch Gabe des HO-1-Aktivators Hämin zusätzlich zu GTN konnten Toleranz und oxidativer Stress verhindert werden. Dagegen wurde bei PETN durch Gabe eines HO-1-Inhibitors Toleranz und oxidativer Stress induziert. Diese Ergebnisse sprechen für eine entscheidende Beteiligung des Enzyms bei der Toleranzentwicklung.<sup>117</sup>

Entscheidend bei allen Vergleichen zwischen PETN und anderen Nitraten ist schließlich noch der Hinweis, ob die pharmakologischen Eigenschaften der verschiedenen Wirkstoffe oder die Charakteristik der *in vivo* Behandlung mit ihnen diskutiert werden. Im Gegensatz zu anderen Nitraten ist PETN selbst nicht bioverfügbar, es taucht also am Wirkort, dem Blutgefäß, nicht auf. Der klinische Effekt mit all seinen Besonderheiten wird demnach durch seine denitrierten Metaboliten wie PEdiN und PEmonoN erzeugt.

### A.3.5 Regulierung der Genexpression durch organische Nitrate

In der Literatur finden sich viele Beispiele für eine Modulation der Genexpression durch NO.<sup>118;119</sup> Dabei können sowohl durch transkriptionelle als auch durch post-transkriptionelle Mechanismen verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF) für die Regulation der Expression wichtiger Proteine oder an die mRNA bindende Proteine (RNA-BP) moduliert werden. Da organische Nitrate als NO-Donoren bzw. NO-Mimetika angesehen werden, ist es wahrscheinlich, dass die Verbindungen bei längerer Anwendung auch einen Effekt auf die Expression multipler Gene haben. Es wurde gezeigt, dass GTN in der Lage ist, beispielsweise im Gehirn die Expression der COX-2 und der NOS1 zu erhöhen.<sup>120;121</sup> Anhand von DNA-Microarray-Analysen konnte zudem an Aorten von GTN-behandelten Ratten eine Regulation von 290 Genen belegt werden.<sup>122</sup>

Auch durch PETN können Änderungen in der Genexpression hervorgerufen werden. Im Gegensatz zu GTN erhöht PETN in humanen Endothelzellen und Schweineaorten die Expression von antioxidativ wirkenden Proteinen wie HO-1 und Ferritin Heavy chain

(FeHc).<sup>115;123;124</sup> Diese Unterschiede in der expressionellen Wirkung beider Substanzen könnten zumindest teilweise die unterschiedliche Entstehung von ROS nach der Behandlung mit diesen Nitraten erklären. Die PETN-vermittelte Erhöhung der HO-1-Expression scheint zum Teil durch eine Stabilisierung der HO-1-mRNA erklärbar zu sein. Zum einen wurde in humanen und murinen Fibroblasten eine Stabilisierung der HO-1-mRNA nach Inkubation mit Spermin-NONOat (Sper-NO) gefunden,<sup>125</sup> zum anderen führt PETN-Inkubation in humanen EA.hy 926 Endothelzellen ebenfalls zur Stabilisierung der HO-1-mRNA.<sup>126</sup>

Zur genaueren Analyse der expressionellen Wirkungen von GTN und PETN wurden DNA-Microarray-Analysen durchgeführt.<sup>127</sup> Nachdem Ratten vier Tage mit GTN oder PETN behandelt wurden, entnahm man ihre Herzen und führte mit der daraus isolierten RNA Experimente durch. Während es durch GTN-Behandlung zur Veränderung der Expression von mehr als 530 Genen kam, konnte nach PETN-Gabe sogar eine Modulation von über 1200 Genen beobachtet werden. Die geringe Schnittmenge von knapp 70 Genen zeigt, dass die Effekte auf die Genexpression sehr unterschiedlich sind.

Eine detaillierte Auswertung der Genexpressionsprofile offenbarte, dass GTN die Exprimierung von solchen Genen steigert, die bei kardiovaskulären Erkrankungen erhöht sind und außerdem die Expression sogenannter „kardioprotektiver“ Gene verringert. PETN induziert hingegen die Expression von Genen, die als Schutzfaktoren vor pathologischen Veränderungen des Herzens gelten und senkt die Genexpression hinsichtlich negativer Faktoren der Pathogenese unterschiedlicher Herzerkrankungen. Für die Induktion von Transkriptionsfaktoren durch GTN und PETN ergab sich ein ähnliches Bild.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in den expressionellen Wirkungen könnte auch hier wieder im aktiven Wirkprinzip beider Substanzen liegen. Während, wie bereits in *Abschnitt A.3.3* erwähnt, immer noch nicht gesichert ist, dass aus GTN wirklich NO freigesetzt wird, scheint dagegen aus PETN direkt NO zu entstehen.<sup>128</sup> Da NO in der Lage ist, die Aktivität verschiedener TF und RNA-BP zu modifizieren, könnte dies die Unterschiede in den Expressionsprofilen erklären.

## B Zielstellung

### B.1 Vorbemerkungen - Apparativer Aufbau

Organbadexperimente an isolierten Gefäßen eignen sich hervorragend zur *in vitro* Ermittlung von Struktur-Wirkungsbeziehungen vasoaktiver Substanzen. Bei den isometrisch aufgenommenen Relaxationskurven können im Gegensatz zu *in vivo* Studien neurohumorale Gegenregulationen sowie pharmakokinetische Parameter ausgeschlossen werden. Es besteht eine hohe Reproduzierbarkeit sowie eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei verhältnismäßig geringem apparativem Aufwand (Abb. B-1). Durch Wiederholung der Relaxationskurven kann außerdem die Toleranzentwicklung des Organs untersucht werden. Des Weiteren lassen sich mit Hilfe spezifischer Inhibitoren, die zum Organbad zugesetzt werden, Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der Substanzen ziehen.

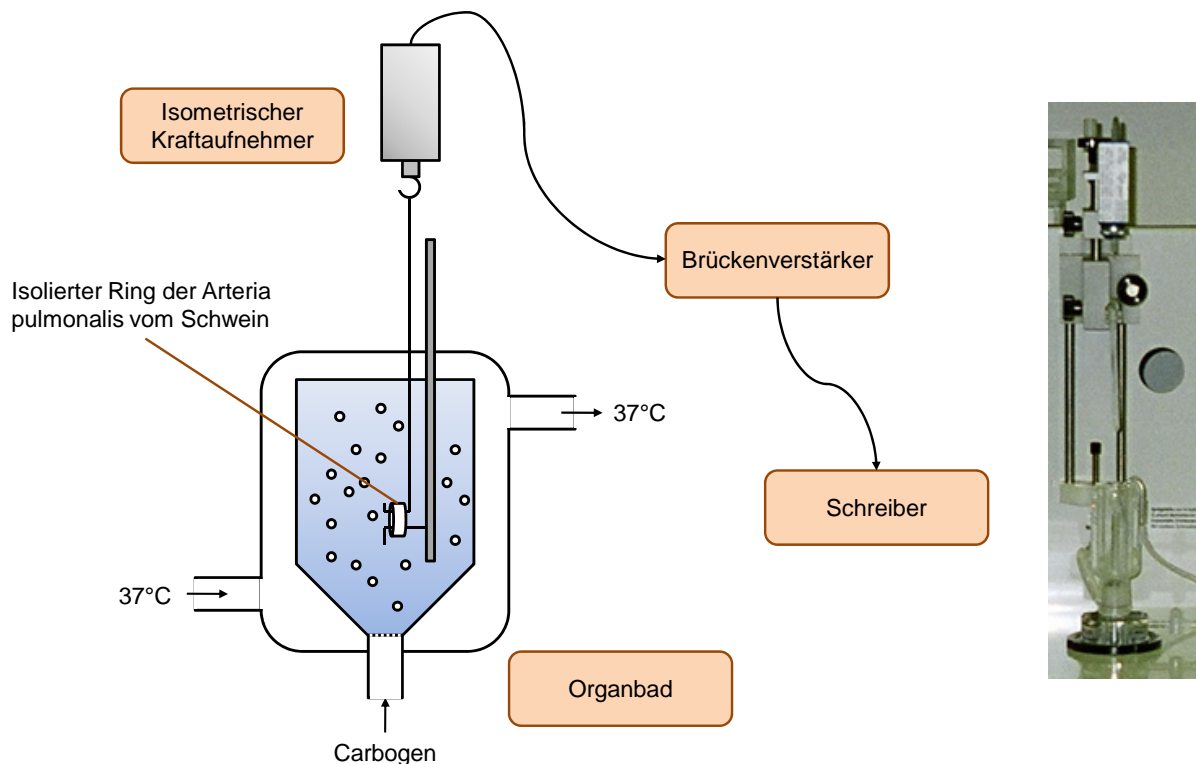


Abb. B-1: Schematischer Aufbau der isolierten Organbadapparatur (links) und Organkammer der verwendeten Organbadapparatur IOA-5306 (rechts).

Zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der organischen Nitrate sollte eine Organbadapparatur in Betrieb genommen und die relaxierende Potenz unterschiedlicher Nitrate an der Arteria pulmonalis des Schweins untersucht werden. Schon frühere Studien in unserer Arbeitsgruppe wurden an diesem Gefäßtyp mit guten Ergebnissen

durchgeführt.<sup>129;130</sup> Die Pulmonalarterie ist leicht aus der Lunge zu isolieren, weist eine intakte Endothelfunktion mit hoher NO-Kapazität auf und ist sensitiv gegenüber Nitraten. Die Zugabe der vasoaktiven Substanzen sollte kumulativ erfolgen, so dass aus der Relaxationskurve die Konzentration ermittelt werden kann, die zu einer halbmaximalen Relaxation führt ( $EC_{50}$ ).

Bei den vergleichenden Untersuchungen zur Entstehung einer *in vitro* Toleranz sollte die Erstinkubation bei allen Vasodilatoren mit Konzentrationen der gleichen Wirkstärke (z. B.  $EC_{100}$ ) vorgenommen werden. Anschließend kann bei einer wiederholten kumulativen Zugabe der Substanz eine zweite Relaxationskurve aufgezeichnet werden, um so die Entwicklung einer *in vitro* Toleranz anhand der Rechtsverschiebung der Kurve zu erkennen.

Näheres zur Methode siehe Veröffentlichung 1 „Materials and Methods“.

## B.2 Wissenschaftliche Problemstellungen

### ***Ermittlung der Struktur-Wirkungsbeziehungen organischer Alkylnitrate***

Bislang wird in der Literatur eine Korrelation zwischen der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül und der Wirkstärke bei einer Reihe von organischen Alkylnitraten festgestellt und auch generell postuliert.<sup>128;130</sup> Mit der etablierten *in vitro* Methode im Organbad sollten die Struktur-Wirkungsbeziehungen weiterer organischer Nitrate untersucht werden. Zum einen sollte auch hier der Einfluss des Trägermoleküls auf die vasodilatatorische Potenz geprüft werden, zum anderen sollte ermittelt werden, inwieweit die Vasoaktivität mit der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül innerhalb der Gruppe der organischen Alkylnitrate in Zusammenhang steht.

### ***Synthese und Charakterisierung neuartiger Aminoalkylnitrat-Verbindungen***

Da einerseits die Bioaktivierung eines Nitrats die Bindung an ein bioaktivierendes Enzym erfordert und andererseits Aminfunktionen in Molekülen erfahrungsgemäß eine Wechselwirkung mit Protein-Targets fördern, sollte der Einfluss von Aminogruppen im organischen Nitrat-Trägermolekül auf die Wirkung untersucht werden. Daher sollte systematisch eine repräsentative Auswahl organischer Aminoalkylnitrate konzipiert, synthetisiert, analytisch gesichert und schließlich im Organbadexperiment pharmakologisch evaluiert werden.

### ***Studien zur Bioaktivierung, in vitro Toleranz und oxidativem Stress von Aminoalkylnitrat***

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Andreas Daiber, Klinikum der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, II. Medizinische Klinik, Kardiologie, sollten drei ausgewählte Aminoalkylnitrate hinsichtlich ihrer Bioaktivierung, Entwicklung von *in vitro* Toleranz und oxidativem Stress beurteilt werden. Es sollte geprüft werden, ob Aminoalkylnitrate, die sich in ihrer Wirkstärke und Anzahl an Nitratgruppen unterscheiden, auch in ihren Eigenschaften, die Aktivierung oder Toleranzentstehung betreffend, variieren.

### ***Untersuchungen zur in vitro Toleranz der organischen Aminoalkylnitrate***

Nach der Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Aminoalkylnitrat und den Ergebnissen des Kooperationsprojektes sollten weitere Aminoalkylnitrate auf die Entwicklung einer *in vitro* Toleranz (Tachyphylaxie) getestet werden. Hierbei sollte in experimentell-pharmakologischen Untersuchungen z. B. ermittelt werden, ob es eine Korrelation zwischen der vasodilatatorischen Aktivität der Aminoalkylnitrate und der Entwicklung einer Tachyphylaxie gibt.

### ***Ermittlung des Bioaktivierungsweges für organische Aminoalkylnitrate***

Wie bereits in der Einleitung (*siehe Abschnitt A.3.3.*) erwähnt, gibt es für organische Nitrate unterschiedliche Bioaktivierungswege. In *in vitro* Untersuchungen sollte mittels Inkubation mit dem ALDH-Inhibitor Benomyl überprüft werden, ob die Gefäßwirkung der Aminoalkylnitrate vermindert wird, ob also die Verbindungen über diesen Bioaktivierungsweg metabolisiert werden.

### ***Studien zur Nachhaltigkeit der Relaxation***

Ein bislang wenig beachteter Aspekt der Struktur-Wirkungsbeziehungen von organischen Nitraten ist die Fähigkeit des Gefäßes, sich nach Bolusgabe eines Nitrats wieder „zu erholen“, also zu rekontrahieren. In den durchgeführten Experimenten sollte überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Wirkstärke eines organischen Nitrats und der Nachhaltigkeit der Relaxation gibt. Zudem sollte die Frage geklärt werden, ob die Erholung der Gefäße von der zugesetzten Nitratkonzentration abhängt.

### ***Pharmakologische Charakterisierung der bioaktiven GTN-Metaboliten***

In Kooperation mit Frau Kathrin Lange aus dem eigenen Arbeitskreis sollten die bioaktiven Metaboliten des GTN untersucht werden. Da diese Metaboliten mitverantwortlich für das klinische Wirkprofil des GTN sind, aber bisher durch unzureichende Verfügbarkeit bei Untersuchungen weitestgehend außer Acht gelassen wurden, sollten mit Hilfe von

experimentellen Studien Aussagen über deren vasodilatatorische Potenz getroffen und Rückschlüsse auf das Wirkprofil gezogen werden.

### ***Pharmakologische Charakterisierung von NO-Donor-Tacrin-Hybridmolekülen***

In Kooperation mit Lei Fang, der ebenfalls im Arbeitskreis von Prof. Lehmann an der Universität Jena tätig war, sollten Hybridmoleküle aus einer Nitrat-Komponente und Tacrinderivaten auf ihre vasodilatatorische Aktivität untersucht werden. Die Verbindungen sollten die Aktivität des Cholinesterase-Inhibitors Tacrin mit den sich positiv auf das pathophysiologische Geschehen bei Morbus Alzheimer auswirkenden Eigenschaften der NO-Donoren, wie z. B. erhöhte Durchblutung und entzündungshemmende Reaktionen im Gehirn, verbinden.

### ***Pharmakologische Charakterisierung von NO-Donor-Statin-Hybridverbindungen***

In Zusammenarbeit mit Frau Claudia Lengfelder aus dem eigenen Arbeitskreis sollten Verbindungen auf ihre Gefäßwirkung untersucht werden, die sowohl ein Statinderivat als auch eine Nitratrest-tragende Untereinheit enthalten. Statine wurden in den letzten Jahren vermehrt auf ihre positive Wirkung bei der Alzheimerschen Erkrankung untersucht.<sup>131</sup> Die synthetisierten Verbindungen sollten wie schon die NO-Donor-Tacrin-Hybride eine synergistische Wirkung in Bezug auf eine mögliche Alzheimer-Therapie aufweisen.

### ***Untersuchungen zur Genexpression organischer Nitrate***

Im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes bei Herrn Prof. Dr. Hartmut Kleinert, Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Pharmakologie, sollte für verschiedene Nitrate mit Hilfe von Studien an humanen Endothelzellen festgestellt werden, ob sie die Expression der Hämoxxygenase-1 beeinflussen. Wie bereits in der Einleitung erörtert (*Abschnitt A.3.4.*), kann durch HO-1-Stimulatoren die Entwicklung einer Nitrattoleranz vermindert werden. Daher sollte überprüft werden, ob sich die toleranzfreien Profile ausgewählter organischer Nitrate auf eine Expression dieses Enzyms zurückführen lassen.

## C Veröffentlichungen

In diesem Abschnitt sind alle Publikationen wiedergegeben, die sich aus den experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorgelegten Dissertation ergeben haben.

### **Publikation 1**

**NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator.**

König, Andreas; Roegler, Carolin; Lange, Kathrin; Daiber, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17, 5881-5.

### **Publikation 2**

**Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-Alzheimer drug candidates.**

Fang, Lei; Appenroth, Dorothea; Decker, Michael; Kiehntopf, Michael; Roegler, Carolin; Deufel, Thomas; Fleck, Christian; Peng, Sixun; Zhang, Yihua; Lehmann, Jochen. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, 51, 713-6.

### **Publikation 3**

**NO donors. Part 18: synthesis and vasorelaxant properties of the bioactive metabolites of GTN and PETN.**

Lange, Kathrin; König, Andreas; Roegler, Carolin; Seeling, Andreas; Lehmann, Jochen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 3141-4.

### **Publikation 4**

**A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena.**

Schuhmacher, Swenja; Schulz, Eberhard; Oelze, Matthias; König, Andreas; Roegler, Carolin; Lange, Kathrin; Sydow, Luise; Kawamoto, Toshihiro; Wenzel, Philipp; Münzel, Thomas; Lehmann, Jochen; Daiber, Andreas. *British Journal of Pharmacology* **2009**, 158, 510-20.

**Publikation 5****Medizinische Chemie der organischen Nitrate und PDE5-Hemmer**

Roegler, Carolin; Lehmann, Jochen. *Pharmazie in unserer Zeit* **2010**, angenommen, erscheint Oktober 2010

**Publikation 6****A novel class of nitrovasodilators – Potency and in-vitro tolerance of organic aminoalkylnitrates.**

Roegler, Carolin; Koenig, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. **2010**, eingereicht am 28.6.2010



## Publikation 1

### **NO Donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator.**

König, Andreas; Roegler, Carolin; Lange, Kathrin;  
Daiber, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen.

*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17, 5881-5.

Diese Veröffentlichung befasst sich mit der Synthese und Struktur-Wirkungsbeziehungen organischer Alkylmononitrate. Es sollte der Einfluss des Nitratrest-tragenden Grundgerüsts auf die Vasoaktivität ermittelt werden. Es wurden 14 Mononitrate synthetisiert und *in vitro* an isolierten Pulmonalarterien hinsichtlich ihrer Gefäßrelaxation getestet. 2-Nitrooxyethylammoniumnitrat erwies sich als hochpotentes organisches Mononitrat, das in seiner Wirkstärke mit GTN vergleichbar ist.

**Eigenanteil:** Durchführung eines Teils der experimentell-pharmakologischen Untersuchungen, Mitwirkung an der Erstellung des Manuskripts.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)Bioorganic &  
Medicinal  
Chemistry  
Letters

Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters 17 (2007) 5881–5885

## NO donors. Part 16: Investigations on structure–activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator<sup>☆</sup>

Andreas Koenig,<sup>a</sup> Carolin Roegler,<sup>a</sup> Kathrin Lange,<sup>a</sup> Andreas Daiber,<sup>b</sup>  
Erika Glusa<sup>a</sup> and Jochen Lehmann<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Lehrstuhl für Pharmazeutisch/Medizinische Chemie, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany

<sup>b</sup>Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, II. Medizinische Klinik, Kardiologie, 55101 Mainz, Germany

Received 24 June 2007; revised 30 July 2007; accepted 1 August 2007  
Available online 28 August 2007

**Abstract**—The vasoactive properties of 14 organic mononitrates were investigated in vitro using PGF<sub>2α</sub>-precontracted porcine pulmonary arteries. A surprisingly wide range of vasorelaxant potencies was observed ( $pD_2$ : 3.36–7.50). Activities showed to be highly sensitive to the molecular structure and the substituents at the molecular carrier of the nitrate group. A correlation between lipophilicity and vasorelaxant potency could not be recognized. 2-Nitrooxyethylammoniumnitrate (**1**) was found to be slightly superior to the high potency trinitrate GTN.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Organic nitrates are useful drugs for the treatment of ischemic heart diseases. The vasoactive response is mediated by a catenary process which includes bioactivation to nitric oxide (NO) and/or related species, and intracellular accumulation of cyclic GMP causing relaxation of vascular smooth muscle cells. Four organic nitrates are used therapeutically: pentaerythrityl tetranitrate (PETN), glyceryl trinitrate (GTN), isosorbide dinitrate (ISDN), and isosorbide mononitrate (ISMN).<sup>2,3</sup> Clinically, GTN represents the most potent compound (daily dosage about 1 mg) but it induces nitrate tolerance. PETN, although having more nitrate groups than the other nitrates, requires the highest daily dosage (50–240 mg), but on the other hand it does not develop significant tolerance.<sup>4</sup> However, experimental in vitro studies (tension measurements) yielded different results. Using PGF<sub>2α</sub>-precontracted porcine pulmonary arteries we have shown that there is a clear correlation between the number of nitrate groups in the molecule and the vasodilator potency and PETN showed to be the most

potent nitrate ( $pD_2$ : 8.18).<sup>1</sup> Low systemic bioavailability for PETN and its active metabolite PETriN<sup>5,6</sup> as well as a limited absorption of its less active metabolites PEDiN and PEmonoN is obviously responsible for the clinical profile of PETN.<sup>1</sup>

Besides the number of nitrate groups, the lipophilicity ( $\log P$ ) and stereochemistry of the nitrate carrier molecule may influence the vasorelaxant potency.<sup>7,8</sup> Furthermore it was reported that the vasoactivities of cyclic organic dinitrate isomers like isoidide dinitrate, isosorbide dinitrate, and isomannide dinitrate differ significantly, although their  $\log P$  were similar.<sup>9,10</sup> The authors assumed that compounds with a nitrate group in the endo position were less potent than exonitrates due to the steric hindrance to endogenous bioactivating ligands. It is supposed that the bioactivating enzyme requires two attachment sites for interaction with the nitrate compound, one involves the oxygen in the nitrate group, while the other seeks another electron-rich center.<sup>11</sup> Moreover, there are two different bioactivation pathways for organic nitrates. Recent results revealed that only the ‘high potency nitrates’ GTN and PETN but not the ‘low potency nitrates’ ISDN and ISMN were bioactivated predominantly by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2).<sup>12–14</sup> At higher concentration (>1  $\mu$ M), GTN and PETN are also subjected

**Keywords:** Organic nitrates; Vasorelaxation; Structure–activity relationships.

<sup>☆</sup> See Ref. 1.

\* Corresponding author. Tel.: +49 3641 949803; fax: +49 3641 949802; e-mail: [j.lehmann@uni-jena.de](mailto:j.lehmann@uni-jena.de)

0960-894X/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.bmcl.2007.08.046

5882

A. Koenig et al. / Bioorg. Med. Chem. Lett. 17 (2007) 5881–5885

**Table 1.** Vasodilatory effects ( $pD_2$ -value and  $EC_{50}$ ) of organic mononitrates, ISDN and GTN, on  $PGF_{2\alpha}$ -precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium

Compound	Structure	$pD_2$	$EC_{50}$ (M)	$n$	Log $P$	Compound	Structure	$pD_2$	$EC_{50}$ (M)	$n$	Log $P$
<b>1<sup>a</sup></b>		7.50 ( $\pm 0.02$ )	$3.15 \times 10^{-8}$	6	0.06 <sup>a</sup>	<b>9</b>		4.48 ( $\pm 0.03$ )	$3.35 \times 10^{-5}$	4	-0.74
<b>2</b>		6.42 ( $\pm 0.04$ )	$3.77 \times 10^{-7}$	3	1.59	<b>10</b>		4.14 ( $\pm 0.02$ )	$7.25 \times 10^{-5}$	7	-0.37
<b>3</b>		6.34 ( $\pm 0.04$ )	$4.12 \times 10^{-7}$	5	2.37	<b>11</b>		4.01 ( $\pm 0.03$ )	$8.77 \times 10^{-5}$	4	1.97
<b>4</b>		5.99 ( $\pm 0.05$ )	$1.03 \times 10^{-6}$	6	0.90	<b>12</b>		3.85 ( $\pm 0.02$ )	$1.41 \times 10^{-4}$	5	2.15
<b>5</b>		5.81 ( $\pm 0.03$ )	$1.54 \times 10^{-6}$	5	2.48	<b>13</b>		3.36 ( $\pm 0.04$ )	$4.35 \times 10^{-4}$	4	1.43
<b>6</b>		5.02 ( $\pm 0.06$ )	$9.56 \times 10^{-6}$	7	0.44	<b>14</b>		<DMSO	>DMSO	8	4.09
<b>7</b>		4.83 ( $\pm 0.03$ )	$1.47 \times 10^{-5}$	9	1.14	GTN		7.44 ( $\pm 0.02$ )	$3.56 \times 10^{-8}$	6	2.21
<b>8</b>		4.48 ( $\pm 0.03$ )	$3.32 \times 10^{-5}$	9	-0.30	ISDN		6.37 ( $\pm 0.03$ )	$4.24 \times 10^{-7}$	7	0.90

The  $pD_2$ -value presents the negative logarithm of the molar concentration producing 50% of the maximum relaxation ( $EC_{50}$ ). Values are means  $\pm$  SEM from  $n$  separate experiments.<sup>a</sup> Applied as 2-nitrooxyethylammoniumnitrate.

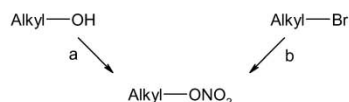
additionally to the 'low potency nitrates' pathway. Most probably, the low potency mononitrates are bioactivated exclusively by cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum for all concentrations.<sup>13</sup>

The correlation between the number of nitrate functions in the molecule and the vasorelaxant potency<sup>1,14,15</sup> prompted us to perform further investigations of structure–activity relationships (SAR) in this class of bioactive compounds, but this time by structural alterations with a fixed number of nitrate groups. Especially organic mononitrates are appropriate for this study. They are less explosive, easy to handle, and the break down to active metabolites can be excluded. In addition, the chemical variation of the organic nitrate carrier molecule is easier than by using di- or trinitrates.

Several methods have been applied for the synthesis of organic nitrates.<sup>16</sup> In this study, the preparation of the mononitrates (Table 1) was accomplished by esterification of the corresponding alkyl alcohols with fuming nitric acid or from the corresponding alkyl bromides by reaction with silver nitrate in acetonitrile, respectively (Scheme 1). The following nitrates were prepared according to procedures reported in the literature: **1**<sup>17,18</sup> from 2-aminoethanol, **2**<sup>19</sup> from 2-bromoethanol, **3**<sup>7</sup> from benzylbromide, **4**<sup>20</sup> from methyl 3-hydroxypropanoate, **5**<sup>21</sup> from 2-hydroxy-1-phenylpropanone, **6**<sup>18</sup> from 3-hydroxypropionic acid, **7**<sup>22</sup> from methyl 3-hydroxy-2,2-dimethylpropanoate and subsequent ester hydrolysis in methanolic sodium hydroxide, **9**<sup>23</sup> from 2-hydroxyethanesulfonic acid, **10** from 2-(bromomethyl)-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (this synthesis will be reported in detail later), and **12**<sup>24</sup> from 1-bromobutane.

The following nitrates were purchased: **11**, **13**, and **14** (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany), GTN (Merck, Darmstadt, Germany). Compound **8** and ISDN were obtained as gift from Schwarz-Pharma AG (Monheim, Germany).

To study SAR without the influence of any pharmacokinetic parameters, tension experiments were performed in organ baths using PGF<sub>2α</sub>-precontracted porcine pulmonary arteries and the vasorelaxant responses for the nitrates were measured and are given in Table 1. According to a previously described protocol,<sup>1</sup> lungs from adult pigs were obtained from the local slaughterhouse. Small branches from pulmonary arteries were prepared and cut into rings (length 2–3 mm, diameter 1.5–2 mm). In experiments with endothelium-denuded rings, the endothelium was removed by gently rubbing



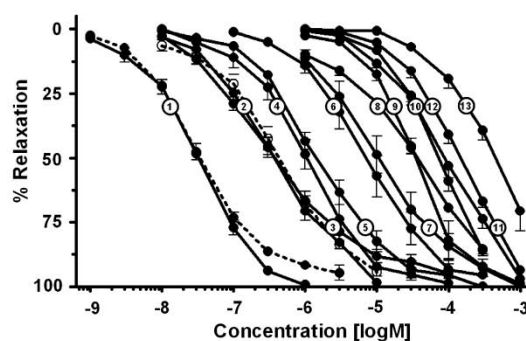
**Scheme 1.** Synthesis of mononitrates from alkyl alcohols and alkyl bromides, respectively: Reagents and conditions: (a) fuming nitric acid, 2 h,  $<10^{\circ}\text{C}$  for **1**, **3**, **7**, and **9**; (b) silver nitrate/acetonitrile, 2–28 d, rt  $50^{\circ}\text{C}$  (depending on the compound) for **2**, **4**, **5**, **6**, **10**, and **12**.

the inner surface with a rough plastic rod. The rings were suspended between two L-shaped platinum hooks and mounted in 10 mL organ baths filled with modified Krebs-Henseleit solution. The solution was kept at 37 °C and aerated with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. The vasorelaxant effects were measured using the PGF<sub>2α</sub> (3 μM)-precontracted rings with a resting tension of 20 mN. The test compounds were added to the organ bath at the contraction plateau in a cumulative manner. Endothelial integrity was assessed by bradykinin (10 nM)-induced relaxation of PGF<sub>2α</sub>-precontracted vessels. In mechanically endothelium-denuded arterial rings, pretreated with 0.2 mM L-NAME, the relaxation induced by bradykinin was less than 10%. Relaxation responses were expressed as a percentage of the PGF<sub>2α</sub> (3 μM)-induced contraction in each tissue.

All of the compounds were able to elicit a significant vasorelaxation in a concentration-dependent manner (Fig. 1) with exception of compound **14**, which induced a very weak relaxation in the range of the pure solvent DMSO. The maximum of vasorelaxation has been achieved throughout for the compounds **1–12** ( $E_{\text{max}} \sim 100\%$ ), compound **13** only performed  $\sim 70\%$  relaxation after adding the selected maximum concentration of 1 mM. The sigmoidal concentration–response curves (Fig. 1) were consistent with the Hill slope for these mononitrates. The concentration–response curves resulting from experiments with endothelium-denuded vessels did not shift significantly, compared to the vessels with intact endothelium (data not shown).

In order to recognize any relationship between vasodilator potency and lipophilicity the  $pD_2$ -values were plotted against the calculated  $\log P$ -values (ACD, Toronto, Canada) (Table 1 and Fig. 2).

According to previous investigations, it had to be expected that the vasorelaxant potency of the organic nitrates investigated should increase with their lipophilicity.<sup>8,9</sup> We have found the calculated log *P*-values for the bioactive nitrates in a wide range of three orders of magnitude (−0.74 to 2.48), but no clear correlation with the vasodilator activity could be recognized (Fig. 2).

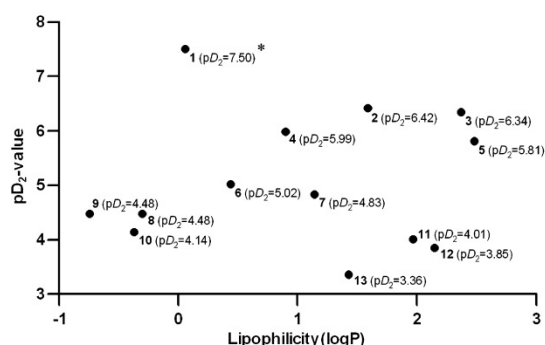


**Figure 1.** Concentration–response curves for the relaxation of PGF<sub>2α</sub>-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium induced by the mononitrates given in Table 1. GTN (—●—) and ISDN (—○—). Mean ± SEM.



5884

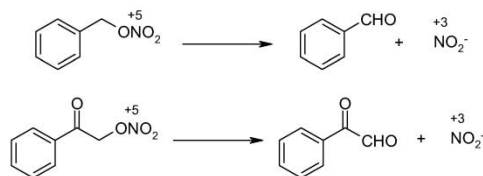
A. Koenig et al. / Bioorg. Med. Chem. Lett. 17 (2007) 5881–5885



**Figure 2.** Relationship between lipophilicity (log *P*) and the concentrations for half maximal relaxation (expressed as *pD*<sub>2</sub>-values) of the organic mononitrates. \*Calculated for the uncharged molecule.

Nevertheless there is a significant influence of the nitrate carrier structures on the vasodilator potency. Compounds bearing the nitrate function attached to bulky and lipophilic carrier molecules without any further functional groups (**11–14**) displayed the lowest activities, particularly the most lipophilic compound **14** which even failed to outperform the solvent DMSO.

Polarization of the nitrate carriers by hydroxylation (**8** and **10**), introduction of hydrophilic cyclic ether (**8**), carboxy (**6** and **7**) or sulfonic acid moieties (**9**) enhances the vasodilator activities significantly. Acidity in general seems to be less crucial. The sulfonic acid **9** is more acidic but less active than the carboxylic acids **6** and **7**. Remarkably, the lipophilic ester **4** is more active than the corresponding less lipophilic acid **6**. It can be speculated that chemically reactive functions such as a carboxylic ester (**4**) or an alkyl bromide (**2**) are able to support the bioactivation of the attached nitrate. Compounds **3** and **5** extremely drop out of any potency/lipophilicity correlation (Fig. 2). We suggest that these unexpected high potencies may be based on a lability of the nitrate functions due to the specific chemical properties of these compounds which are not present in all of the other structures. Both, benzylnitrates and  $\alpha$ -nitratophenones are capable to decompose in terms of a disproportionation.<sup>21</sup> Scheme 2 demonstrates that both structures may be considered as 'self-reducing nitrates'. Independently whether disproportionations as outlined in Scheme 2 will be performed under physiological conditions, we suggest that these properties support the bioactivation of the organic nitrate to break-down species.



**Scheme 2.** Disproportionation of benzylnitrates and  $\alpha$ -nitratophenones.<sup>21</sup>

The 2-amino-substituted ethylmononitrate **1** was found to be the most potent mononitrate with *pD*<sub>2</sub> = 7.50. This surprising result indicates that in addition to previous observations<sup>1</sup> the number of nitrate moieties in the vasodilator compound is not necessarily the leading parameter for vasodilator potency. Recently, we speculated that the reactivity of oligonitrates, which is directly correlated with the number of nitrate groups, determines the vasodilator potency of organic nitrates and whether they are bioactivated by ALDH-2 or not.<sup>12</sup> Probably, the reactivity can also be increased by insertion of other functional groups (Table 1). Compound **1** showed to be more potent than all of the dinitrates investigated up to now and furthermore it reaches the efficacy of the most potent trinitrate GTN (*pD*<sub>2</sub> = 7.44).

Contradictory to the idea that the structure of the organic carrier is more or less negligible with regard to the biological activity, the present results reveal that the carrier molecule and its substituents are highly important. The vasoactivity of nitrovasodilators is definitively more sensitive to the functional groups rather than to the lipophilicity of the compounds. Therefore, we conclude that this is due to the significant differences in the binding affinities for the nitrate bioactivating enzymes ALDH-2 and cytochrome P450. It is suggested that these affinities for the binding areas of the enzymes are determined not only by the stereochemistry and the physicochemical properties of the compounds but in first line by polar substituents which are able to perform additional binding options. In particular, the primary protonated amino group in compound **1** is capable of improving the binding to the target enzyme.

#### Acknowledgment

A Ph.D. scholarship for A.K. by Graduiertenförderung (Thuringia, Germany) is gratefully acknowledged.

#### References and notes

- Koenig, A.; Lange, K.; Konter, J.; Daiber, A.; Stalleicken, D.; Glusa, E.; Lehmann, J. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2007**, *50*, 68.
- Ahlner, J.; Andersson, R. G.; Torfgard, K.; Axelsson, K. L. *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 351.
- Parker, J. D.; Parker, J. O. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 520.
- Jurt, U.; Gori, T.; Ravandi, A.; Babaei, S.; Zeman, P.; Parker, J. D. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *38*, 854.
- Wenzel, P.; Oelze, M.; Coldewey, M.; Hortmann, M.; Seeling, A.; Hink, U.; Mollnau, H.; Stalleicken, D.; Weiner, H.; Lehmann, J.; Li, H.; Forstermann, U.; Munzel, T.; Daiber, A. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 1729.
- Seeling, A.; Lehmann, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 1131.
- Wessler, C.; Homann, A.; Fricke, U.; Lehmann, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 581.
- Noack, E. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **1984**, *6*, 583.

9. Bron, J.; Sterk, G. J.; Vanderwerf, J. F.; Timmerman, H. *Pharm. World Sci.* **1995**, *17*, 120.
10. Bogaert, M. G.; Rosseel, M. T. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1972**, *275*, 339.
11. Tzeng, T. B.; Fung, H. L. *Med. Hypotheses* **1992**, *37*, 58.
12. Chen, Z. Q.; Zhang, J.; Stamler, J. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 8306.
13. Munzel, T.; Daiber, A.; Mulsch, A. *Circ. Res.* **2005**, *97*, 618.
14. Wenzel, P.; Hink, U.; Oelze, M.; Seeling, A.; Isse, T.; Bruns, K.; Steinhoff, L.; Brandt, M.; Kleschyov, A. L.; Schulz, E.; Lange, K.; Weiner, H.; Lehmann, J.; Lackner, K. J.; Kawamoto, T.; Munzel, T.; Daiber, A. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 526.
15. Daiber, A.; Oelze, M.; Coldewey, M.; Bachschmid, M.; Wenzel, P.; Sydow, K.; Wendt, M.; Kleschyov, A. L.; Stalleicken, D.; Ullrich, V.; Mulsch, A.; Munzel, T. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1372.
16. Boschan, R.; Merrow, R. T.; Vandolah, R. W. *Chem. Rev.* **1955**, *55*, 485.
17. Berthmann, A.; Ratz, H.. In *Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie*; Bayer, E., Berthmann, A., Hausweiler, A., Eds.; Thieme: Stuttgart, 1963; Vol. 6, p 329.
18. Ishihara, S.; Saito, F.; Ohhata, Y.; Kanai, M.; Mizuno, H.; Fujisawa, M.; Yorikane, R.; Koike, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1527.
19. Kartasmita, R. E.; Laufer, S.; Lehmann, J. *Arch. Pharm.* **2002**, *335*, 363.
20. McCallum, K. S.; Emmons, W. D. *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 367.
21. Emmons, W. D.; Freeman, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4415.
22. Decker, M.; Koenig, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4995.
23. Whewell, C. U.S. Patent 20,060,293,384, 2006.
24. Muthuramu, K.; Shepson, P. B.; O'Brien, J. M. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 1117.





## Publikation 2

### **Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-Alzheimer drug candidates.**

Fang, Lei; Appenroth, Dorothea; Decker, Michael; Kiehnkopf, Michael;  
Roegler, Carolin; Deufel, Thomas; Fleck, Christian;  
Peng, Sixun; Zhang, Yihua; Lehmann, Jochen.

*Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51, 713-6.

Gegenstand dieser Veröffentlichung sind NO-Donor- und Nitrat-Tacrin-Hybridmoleküle, welche durch Kombination der Wirkprinzipien beider Substanzklassen zu einem verbesserten Effekt in der Alzheimer-Therapie führen sollen. Vorgestellt werden die Synthese der Substanzen sowie pharmakologische Testung im Hinblick auf Inhibition der Acetylcholinesterase, Vasorelaxation und Hepatotoxizität. Die vier auf Vasoaktivität geprüften Substanzen erwiesen sich als moderate Vasodilatoren, vergleichbar mit bereits untersuchten Mononitraten.

**Eigenanteil:** Vergleichende experimentelle Messung der Hybridmoleküle hinsichtlich ihrer vasorelaxierenden Eigenschaften, Auswertung der Daten, Mitwirkung an der Erstellung des Manuskripts.



## Letters

**Synthesis and Biological Evaluation of NO-Donor-Tacrine Hybrids as Hepatoprotective Anti-Alzheimer Drug Candidates**

Lei Fang,<sup>†,‡</sup> Dorothea Appenroth,<sup>§</sup> Michael Decker,<sup>†,⊥</sup> Michael Kiehnopf,<sup>#</sup> Carolin Roegler,<sup>†</sup> Thomas Deufel,<sup>#</sup> Christian Fleck,<sup>§</sup> Sixun Peng,<sup>‡</sup> Yihua Zhang,<sup>\*,‡</sup> and Jochen Lehmann<sup>\*,†</sup>

*Institute of Pharmacy, Institute of Pharmacology and Toxicology, and Institute of Clinical Chemistry, Friedrich-Schiller-University Jena, D-07743 Jena, Germany, Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, 210009 Nanjing, People's Republic of China, and Medicinal Chemistry Program, McLean Hospital, Harvard Medical School, Belmont, Massachusetts 02478*

Received November 30, 2007

**Abstract:** In search of safer anti-Alzheimer drugs, 14 NO-donor-tacrine hybrids (**1–14**) were synthesized and evaluated for their ability to inhibit cholinesterases and for vasorelaxation effects. Compounds **1–13** showed good cholinesterases inhibitory activities in vitro, while **14**, particularly, was highly selective, preferring butyrylcholinesterase rather than acetylcholinesterase. Four selected compounds (**1**, **9**, **11**, and **14**) moderately relaxed the porcine pulmonary arteries in organ bath. In the hepatotoxicity study, significant hepatotoxicity was caused by tacrine but not by **9**.

Alzheimer's disease (AD<sup>1</sup>) is recognized as one of the most severe conditions affecting the aged and is life-threatening for this group of people. The disease is characterized by neuronal loss, synaptic damage, and vascular plaques. Many pathologic factors, such as the deficiency of synaptic acetylcholine (ACh) and other related neurotransmitters, the formation of neuritic and vascular plaque, poor blood supply in the brain, and the inflammation of neurons, are known to cause this disease.<sup>1</sup> Over time, the knowledge about pathogenesis and the development of the neurodegeneration associated with AD has been organized into two main theories, namely, the cholinergic and the amyloid hypotheses, which focus on the loss of cholinergic neurotransmission and the emergence of the toxic amyloid plaque, respectively.<sup>2</sup> To date, most of the therapeutic strategies for patients with AD are based on these two theories. Tacrine, a reversible acetylcholinesterase inhibitor (AChEI), is one of the

major drugs approved for the clinical treatment of AD.<sup>3,4</sup> The rationale for its use was related to the elevation of ACh levels that can compensate for the cholinergic deficiency associated with the brain lesions in patients with AD. Nevertheless, the deficiency of tacrine in clinic has been related mainly to elevated liver transaminase levels and dose-related, low-selective peripheral cholinergic effects. And it can halt the progression of AD for only about a year.<sup>5,6</sup> Thus, the search for tacrine analogues or related new candidates is still of interest to medicinal chemists involved in AD research.

Developing novel agents with multiple effects is one of common strategies in today's search for new treatments of AD.<sup>7,8</sup> Many such compounds have been reported, such as homodimeric tacrine congeners,<sup>9</sup> lipoic acid-tacrine hybrids,<sup>10</sup> tacrine-dihydropyridine hybrids,<sup>11</sup> galantamine-nitrate derivatives,<sup>12</sup> and so on. The activity of many of these compounds has been improved by the introduction of the second pharmacophores. Here we have designed and synthesized a series of tacrine hybrids with NO-donating nitrate- and diazeniumdiolate (NONOate) moieties connected via an alkylenediamine-type spacer. NO-releasing derivatives have currently come into focus in the treatment of cancer, inflammation, and vascular diseases. Some of them have performed fairly well because NO is a key signaling molecule involved in the regulation of many physiological processes.<sup>13</sup> NO is also reported to play an important role in the nervous system and some NO donors or NO mimetic molecules have had a positive effect on the treatment of AD.<sup>14</sup> Though the mechanism is not yet clear, two effects of NO might be very important: it increases blood supply and it relieves inflammatory reactions in the brain, both of which are therapeutically beneficial for patients with AD. In the design of the target molecules, an alkylenediamine side chain is introduced at the 9-position of the tacrine-like heterocycle. The side chain is considered to be not only as a spacer between tacrine and the NO donor, but also beneficial for inhibiting the periphery anion site (PAS) of AChE,<sup>10</sup> which is thought to relate to the neurotoxic cascade of AD through AChE-induced amyloid- $\beta$  aggregation.<sup>15</sup> In addition, a protonatable nitrogen containing side chain of the tacrine-like heterocycle has been suggested to significantly improve the inhibitory potency of cholinesterase (ChE) because of the interaction with the midgorge recognition site.<sup>16</sup> Therefore, the rationale of the target compounds is a synergic action of the NO donor, the tacrine-like heterocycle and the alkylenediamine spacer might yield potent but less toxic drug candidates for the better and safer treatment of AD.

The synthesis of amine- and amide-linked nitrate- and NONOate-tacrine hybrids is outlined in Schemes 1 and 2. Because an alkylenediamine side chain was introduced to the hybrids, the synthesis did not utilize tacrine itself as a starting material, but 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine<sup>17</sup> was reacted with alkylenediamines to produce the important intermediates 9-aminoalkylamino-1,2,3,4-tetrahydroacridines **15a,b**. To synthesize the amine-linked tacrine hybrids **5–10**, the bromoalkanols were nitrated by 100% HNO<sub>3</sub> and, subsequently, the bromoalkylnitrates were condensed with **15** to yield the target compounds. Intermediates **15a,b** were acylated by the corresponding bromoacyl chloride to give the halogenated intermediates **16a–d** and then conveniently converted to the amide-linked

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: +49-3641-94-9803 (J.L.); +86-25-86635503 (Y.Z.). Fax: +49-3641-94-9802 (J.L.); +86-25-86635503 (Y.Z.). E-mail: j.lehmann@uni-jena.de (J.L.); zyhtgd@sohu.com (Y.Z.).

<sup>†</sup> Institute of Pharmacy, Friedrich-Schiller-University Jena.

<sup>‡</sup> China Pharmaceutical University.

<sup>§</sup> Institute of Pharmacology and Toxicology, Friedrich-Schiller-University Jena.

<sup>⊥</sup> Harvard Medical School.

<sup>#</sup> Institute of Clinical Chemistry, Friedrich-Schiller-University Jena

<sup>a</sup> Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; ACh, acetylcholine; AChEI, acetylcholinesterase inhibitor; PAS, peripheral anionic site; ChE, cholinesterase; HMPA, hexamethylphosphotriamide; CDI, *N,N'*-carbonyldiimidazole; BuChE, butyrylcholinesterase; ISDN, isosorbide dinitrate; ASAT, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase.

The ChE inhibitory activity of **1–14** was measured in vitro using Ellman's assay<sup>20,21</sup> (Table 1). With the exception of **14** (226.0 nM), all target compounds showed good inhibitory activity against AChE with IC<sub>50</sub> values varying from 5.2 to 93 nM. Compared to tacrine (45 nM), the potency of **6**, **7**, and **9** (6.4, 6.3, and 5.6 nM) is 7 ~ 8-fold improved. The effect levels of all compounds against butyrylcholinesterase (BuChE) were also similar to tacrine (5.1 nM) with IC<sub>50</sub> values varying from 5.2 to 41.0 nM. These results seem consistent with the previous reports of lipoic acid-tacrine hybrids<sup>10</sup> and huperzine A-tacrine hybrids.<sup>16</sup> Among all of the compounds, compound **6** and **9** showed potent inhibitory effects on both AChE and BuChE, while **14** seems special, showing a significant selectivity toward BuChE with a 31-fold selective ratio. BuChE inhibition has



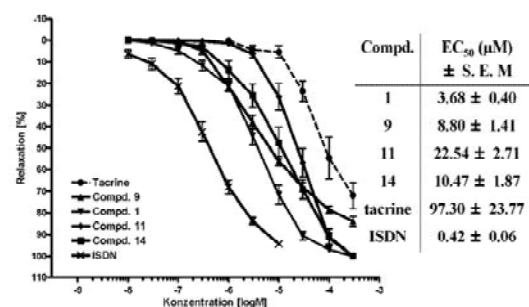
## Letters

Journal of Medicinal Chemistry, 2008, Vol. 51, No. 4 715

recently been regarded as therapeutically beneficial for AD, because BuChE seems able to act as an alternative to compensate AChE for processing of AD.<sup>22</sup> The selectivity of **14** is likely due to the large steric hindrance of the spacer. At the midgorge level AChE and BuChE differ in their amino acid composition, because AChE presents several aromatic residues that are replaced by smaller aliphatic ones in BuChE. These structural differences are supposed to be responsible for the larger electrostatic gradient and for the narrower void along the AChE gorge with respect to BuChE.<sup>23</sup> Given the considerable steric demand of **14**, it seems understandable that **14** binds to BuChE much more easily than to AChE. To determine the influence of the nitrate group on the selectivity of BuChE, compound **21** was also synthesized and screened for its ability to inhibit ChEs. The results showed the ability of **21** to inhibit AChE (21.6 nM) is significantly improved compared to **14** (226.0 nM), while the ability to inhibit BuChE is reduced. Thus, the selectivity toward BuChE disappears, which indicates the nitrate group of **14** may be necessary for developing such selectivity, though whether the influence of the nitrate group originates from the electrostatic effect or the steric hindrance remains unclear.

The poor blood supply to the brain has recently been considered an important pathologic factor initiating the progression of AD. NO donors can significantly increase blood supply by relaxing vessels.<sup>24</sup> To determine their vasorelaxation effects, compounds **1**, **9**, **11**, and **14**, which effectively inhibited ChEs in vitro and stand for the amide-linked nitrate derivatives, amine-linked nitrate derivatives, NONOate derivatives, and pivalic acid-linked derivatives, respectively, were selected for use in an in vitro vascular relaxation assay (organ bath) using PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -precontracted porcine pulmonary arteries. Isosorbide dinitrate (ISDN) and tacrine were chosen as positive and negative controls, respectively. The results are shown in Figure 1. Expectedly, ISDN showed the strongest activity with an EC<sub>50</sub> value of 0.42  $\mu$ M. Compared to tacrine, compounds **1**, **9**, and **14** showed moderate vasorelaxation effects with EC<sub>50</sub> values varying from 3.68 to 10.47  $\mu$ M, while the activity of **11** is relatively low, with an EC<sub>50</sub> value of 22.54  $\mu$ M. In this tacrine-NONOate hybrid, the NONOate moiety is protected prodrug-like and, thus, can not spontaneously release NO under the in vitro conditions of the organ bath.

The hepatotoxicity is a main limitation for the clinical use of tacrine. It is reported to elevate levels of liver transaminase and decrease albumin concentration.<sup>25</sup> NO production in the liver is usually increased in response to acute insult with hepatotoxicants and may become a mediator of the tissue damage.<sup>26</sup> Some NO donors, like V-PYRRO/NO<sup>27</sup> and nitrate,<sup>28</sup> are reportedly able to prevent the liver from injury. To determine whether the introduction of a NO donor could improve the safety



**Figure 1.** Concentration–response curves for the vasorelaxant effects of tacrine, ISDN, and compounds **1**, **9**, **11**, and **14** on PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (3 mM)-precontracted porcine pulmonary arteries in vitro. Data are means  $\pm$  SEM from 4 to 6 independent experiments.

of the parent compound, compound **9** was chosen to be tested its hepatotoxicity. After equimolar doses of tacrine and **9** were administered, levels of aspartate aminotransferase (ASAT), lactate dehydrogenase (LDH) and albumin in serum as well as the concentration of protein in liver tissue were investigated (Table 2). Compared to the control, significant hepatotoxicity was caused by tacrine, as indicated by the increased activity of the ASAT and LDH as well as by the reduced concentration of albumin and protein in liver tissue. In contrast, the values in compound **9** group appeared to remain unchanged. Clearly, compound **9** did not show any hepatotoxicity, but tacrine did.

In summary, we have designed and synthesized 14 novel tacrine hybrid compounds with NO-donating nitrate and NONOate moieties connected to the tacrine template via an alkylenediamine-type spacer. All compounds effectively inhibited ChEs in vitro. Three target compounds (**6**, **7**, and **9**), in particular, showed 7 ~ 8-fold higher AChE inhibitory activity compared to tacrine, while compound **14** was found to be selective toward BuChE rather than AChE. Compounds **1**, **9**, **11**, and **14** moderately relaxed the porcine pulmonary arteries in in vitro vasorelaxation experiments (organ bath), aided by the NO donor part of the molecule. In the in vivo hepatotoxicity studies, tacrine, but not compound **9**, was found to cause serious hepatotoxicity. The results suggest that these NO-donor-tacrine hybrids, especially compound **9**, may be considered to be novel more potent and safer anti-Alzheimer's drug candidates.

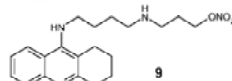
**Acknowledgment.** The financial support of "DAAD Sandwich Program" Scholarship (08. 2006 ~ 09. 2008) is very gratefully acknowledged. Appreciation is expressed to Mrs. Petra Wiecha for the technical assistance.

**Supporting Information Available:** Experimental procedures for the synthesis of **1–14** and detailed procedures of pharmacologi-

**Table 2.** Influence of Equimolar Doses (5.93  $\mu$ mol/100 g b.wt.) of Tacrine and **9** on the Activity of ASAT and LDH, as well as the Albumin Concentration in Serum, and Protein Concentration in Liver Tissue<sup>a</sup>

time	serum						liver tissue	
	ASAT [ $\mu$ mol/s]		albumin [g/l]		LDH [ $\mu$ mol/s]		protein [mg/g]	
	tacrine	cmpd <b>9</b>	tacrine	cmpd <b>9</b>	tacrine	cmpd <b>9</b>	tacrine	cmpd <b>9</b>
before	2.5 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.2	16.3 $\pm$ 0.5	16.7 $\pm$ 0.5	4.2 $\pm$ 0.8	4.6 $\pm$ 0.6	138 $\pm$ 1	
12 h	4.5 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	2.3 $\pm$ 0.2	16.0 $\pm$ 0.4	16.6 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.9	4.4 $\pm$ 0.6	n.d.	n.d.
20 h	3.4 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.4	15.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	17.1 $\pm$ 0.6	10.0 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>	5.6 $\pm$ 0.3	118 $\pm$ 4	143 $\pm$ 1
36 h	3.1 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.2	13.1 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	15.1 $\pm$ 0.7	6.5 $\pm$ 1.5	4.1 $\pm$ 0.4	92 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	123 $\pm$ 9

<sup>a</sup> Results are compared to control values before the administration. <sup>b</sup> Statistical significant difference to control values before administration (Student's *t*-test, *p*  $\leq$  0.05, *n* = 3–6).



cal investigations (ChE inhibition assay, vascular relaxation study, and hepatotoxicity study). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References

- Francotte, P.; Graindorge, E.; Boveriea, S.; de Tullio, P.; Pirotea, B. New Trends in the Design of Drugs against Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1757–1778.
- Scarpini, E.; Scheltens, P.; Feldman, H. Treatment of Alzheimer's Disease: Current Status and New Perspectives. *Neurology* **2003**, *2*, 539–547.
- Knapp, M. J.; Knopman, D. S.; Solomon, P. R.; Pendlebury, W. W.; Davis, C. S.; Gracon, S. I. A 30-week Randomized Controlled Trial of High-Dose Tacrine in Patients with Alzheimer's Disease. *J. Am. Med. Assoc.* **1994**, *271*, 985–991.
- Crismon, M. L. Tacrine: First Drug Approved for Alzheimer's Disease. *Ann. Pharmacother.* **1994**, *28*, 744–751.
- Watkins, P. B.; Zimmerman, H. J.; Knapp, M. J.; Gracon, S. I.; Lewis, K. W. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients with Alzheimer's Disease. *J. Am. Med. Assoc.* **1994**, *271*, 992–998.
- Ames, D. J.; Bhathal, P. S.; Davies, B. M.; Fraser, J. R. E.; Gibson, P. R.; Roberts, S. Heterogeneity of Adverse Hepatic Reactions to Tetrahydroaminoacridine. *N. Z. J. Med.* **1990**, *20*, 193–195.
- Decker, M. Recent Advances in the Development of Hybrid Molecules/Designed Multiple Compounds with Antiamnesic Properties. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 221–229.
- Youdim, M. B. H.; Buccafusco, J. J. Multi-Functional Drugs for Various CNS Targets in the Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 27–35.
- (a) Hu, M. K.; Wu, L. J.; Hsiao, G.; Yen, M. H. Homodimeric Tacrine Congeners as Acetylcholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2277–2282. (b) Carlier, P. R.; Chow, E. S.-H.; Han, Y.; Liu, J.; Yazal, J. E.; Pang, Y.-P. Heterodimeric Tacrine-Based Acetylcholinesterase Inhibitors: Investigating Ligand-Peripheral Site Interactions. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4225–4231. (c) Carlier, P. R.; Du, D.-M.; Han, Y.-F.; Liu, J.; Pang, Y.-P. Potent Easily Synthesized Huperzine A-Tacrine Hybrid Acetylcholinesterase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2335–2338.
- Rosini, M.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Bolognesi, M. L.; Hrelia, P.; Minarini, A.; Tarozzi, A.; Melchiorre, C. Rational Approach To Discover Multipotent Anti-Alzheimer Drugs. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 360–363.
- Marco-Contelles, J.; León, R.; de los Ríos, C.; Guglietta, A.; Terencio, J.; López, M. G.; García, A. G.; Villarroya, M. Novel Multipotent Tacrine-Dihydropyridine Hybrids with Improved Acetylcholinesterase Inhibitory and Neuroprotective Activities as Potential Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7607–7610.
- Perissutti, E.; Fiorino, F.; Severino, B.; Frecentese, F.; Massarelli, P.; Nencini, C.; Santagada, V.; Caliendo, G. Synthesis of 6 $\beta$ -D-Glucosyl and 6-Nitroxy (–)-Galanthamine Derivatives as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Pharmazie* **2007**, *62*, 403–405.
- Megson, I. L.; Webb, D. J. Nitric Oxide Donor Drugs: Current Status and Future Trends. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2002**, *11*, 587–601.
- Thatcher, G. R. J.; Bennett, B. M.; Reynolds, J. N. Nitric Oxide Mimetic Molecules as Therapeutic Agents in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, *2*, 171–182.
- Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V.  $\beta$ -Amyloid Aggregation Induced by Human Acetylcholinesterase: Inhibition Studies. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 407–416.
- Gemma, S.; Gabellieri, E.; Huleatt, P.; Fattorusso, C.; Borriello, M.; Catalanotti, B.; Butini, S.; De Angelis, M.; Novellino, E.; Nacci, V.; Belinskaya, T.; Saxena, A.; Campiani, G. Discovery of Huperzine A-Tacrine Hybrids as Potent Inhibitors of Human Cholinesterases Targeting Their Midgorge Recognition Sites. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3421–3425.
- Carlier, P. R.; Han, Y. F.; Chow, E. S.-H.; Li, C. P.-L.; Wang, H.; Lieu, T. X.; Wong, H. S.; Pang, Y.-P. Evaluation of Short-Tether Bis-THA AChE Inhibitors. A Further Test of the Dual Binding Site Hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 351–357.
- Velázquez, C.; Rao, P. N. P.; Knaus, E. E. Novel Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Possessing a Nitric Oxide Donor Diazen-1-ium-1,2-diolate Moiety: Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Nitric Oxide Release Studies. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4061–4067.
- Decker, M.; Koenig, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. Synthesis and Vasorelaxant Properties of Hybrid Molecules Out of NO-Donors and the Beta-Receptor Blocking Drug Propranolol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4995–4997.
- Decker, M. Novel Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase Derived from the Alkaloids Dehydroevodiamine and Rutacarpine. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 305–313.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
- Giacobini, E. *Cognitive Enhancing Drugs*; Birkhäuser Verlag: Basel, Boston, Berlin, 2004; pp 11–36.
- Saxena, A.; Redman, A. M. G.; Jiang, X.; Lockridge, O.; Doctor, B. P. Differences in Active Site Gorge Dimension of Cholinesterases Revealed by Binding of Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **1997**, *36*, 14642–14651.
- Duncan, A. J.; Heales, S. J. R. Nitric Oxide and Neurological Disorders. *Mol. Aspects Med.* **2005**, *26*, 67–96.
- Gracon, S. I.; Knapp, M. J.; Berghoff, W. G.; Pierce, M.; de Jong, R.; Lobbestael, S. J.; Symons, J.; Dombey, S. L.; Luscombe, F. A.; Kraemer, D. Safety of Tacrine: Clinical Trials, Treatment IND, and Postmarketing Experience. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **1998**, *12*, 93–101.
- Liu, J.; Waalkes, M. P. Nitric Oxide and Chemically Induced Hepatotoxicity: Beneficial Effects of the Liver-Selective Nitric Oxide Donor, V-PYRRO/NO. *Toxicology* **2005**, *208*, 289–297.
- Liu, J.; Qu, W.; Saavedra, J. E.; Waalkes, M. P. The Nitric Oxide Donor, O<sub>2</sub>-vinyl 1-(Pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (V-PYRRO/NO), Protects against Cadmium-Induced Hepatotoxicity in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 18–24.
- Futter, L. E.; al-Swayeh, O. A.; Moore, P. K. A Comparison of the Effect of Nitroparacetamol and Paracetamol on Liver Injury. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 10–12.

JM701491K

### Publikation 3

#### **NO donors. Part 18: synthesis and vasorelaxant properties of the bioactive metabolites of GTN and PETN.**

Lange, Kathrin; König, Andreas; Roegler, Carolin;  
Seeling, Andreas; Lehmann, Jochen.

*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 3141-4.

Diese Veröffentlichung beschreibt die Synthese der bioaktiven Metaboliten der Arzneistoffe GTN und PETN. Die Metaboliten dienen zur Charakterisierung von pharmakokinetischen Eigenschaften und der klinischen Wirkprofile beider Substanzen. Zudem wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen der Metaboliten ermittelt. Eine Abhängigkeit zwischen der Wirkstärke und der Anzahl der Nitratgruppen konnte bestätigt werden. Jedoch zeigte sich auch, dass die Position des Nitratrestes am Trägermolekül das Ausmaß der Gefäßrelaxation beeinflusst.

**Eigenanteil:** Untersuchung der GTN-Metaboliten im Organbad, Auswertung der Daten, Mitwirkung an der Erstellung des Manuskripts.







Available online at www.sciencedirect.com

Bioorganic &  
Medicinal  
Chemistry  
Letters

Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters 19 (2009) 3141–3144

## NO donors. Part 18: Bioactive metabolites of GTN and PETN—Synthesis and vasorelaxant properties<sup>☆</sup>

Kathrin Lange, Andreas Koenig, Carolin Roegler, Andreas Seeling and Jochen Lehmann\*

*Lehrstuhl für Pharmazeutisch/Medizinische Chemie, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Thuringia, Germany*

Received 18 February 2008; revised 23 April 2008; accepted 23 April 2008

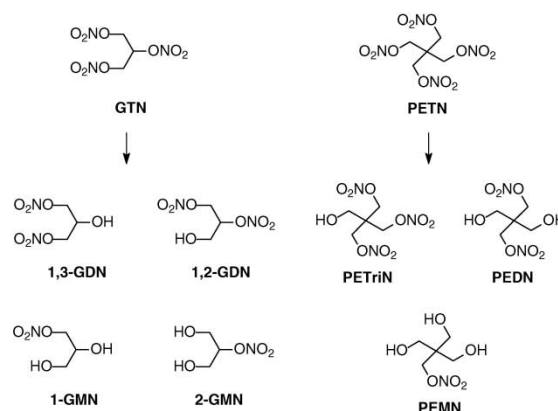
Available online 26 April 2008

**Abstract**—The vasodilators glyceryl trinitrate (GTN) and pentaerythritol tetranitrate (PETN) are supposed to be degraded in vivo to the lower nitrates PETriN, PEDN, PEMN, 1,2-GDN, 1,3-GDN, 1-GMN, and 2-GMN. We synthesized these bioactive metabolites as reference compounds for pharmacokinetic studies. The use of HPLC-methods for monitoring the stepwise reduction of PETN to lower nitrates and the syntheses of the glyceryl dinitrates proved advantageous. Furthermore, we measured the vasorelaxant properties of all metabolites by performing organ bath experiments with porcine pulmonary arteries. In general, the vasodilator potency increases with the number of nitrate moieties in the compound.

© 2009 Published by Elsevier Ltd.

Glyceryl trinitrate (GTN), pentaerythritol tetranitrate (PETN), isosorbide dinitrate (ISDN), and isosorbide-5-mononitrate (5-ISMN) are used in the therapy of cardiovascular diseases. These compounds are supposed to be enzymatically bioactivated in order to liberate nitric oxide as the vasorelaxant factor. Not only this bioactivation process but also chemical or enzymatic degradation in vivo may generate lower bioactive nitrates from GTN, PETN, and ISDN.<sup>2,3</sup>

Accordingly, the clinical profiles may result not only from the initially administered oligonitrates; but also and even predominantly<sup>4</sup> from the action of the metabolites. Many studies were carried out with PETN and GTN without looking at the bioactive metabolites. The very limited availability of the metabolites for pharmacological and analytical purposes may be one of the reasons for this restriction. We therefore synthesized and characterized pharmacologically the potential bioactive metabolites of GTN and PETN in order to estimate their possible contributions to the overall effect of the substances (Fig. 1).



**Figure 1.** Potential bioactive metabolites of PETN and GTN.

Several strategies were applied to synthesize organic nitrates.<sup>5,6</sup> We performed the synthesis of the PETN-metabolites pentaerythritol trinitrate (PETriN) and pentaerythritol dinitrate (PEDN) similarly to Hess<sup>12</sup> by reductively degrading PETN with different molar amounts of hydrazine hydrate (2:1 for PETriN, 8:1 for PEDN) in boiling mixtures of ethanol and dioxane (Scheme 1).

Treating an organic nitrate with hydrazine hydrate results among other compounds in the formation of inor-

**Keywords:** Organic nitrates; Metabolites; GTN; PETN.

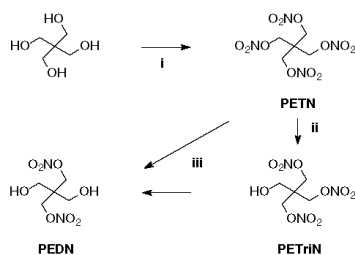
<sup>☆</sup> See Ref. 1.

\* Corresponding author. Tel.: +49 3641 949803; fax +49 3641 949 802; e-mail: j.lehmann@uni-jena.de

0960-894X/\$ - see front matter © 2009 Published by Elsevier Ltd.  
doi:10.1016/j.bmcl.2008.04.057

3142

K. Lange et al. / Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 3141–3144



**Scheme 1.** Synthesis of PETN, PETriN, and PEDN. Reagents and conditions: (i) nitric acid (100%), 4 h,  $-5$  to  $-10$  °C; (ii) hydrazine hydrate, dioxane, ethanol, 3 h, reflux; (iii) hydrazine hydrate, dioxane, ethanol, 6.5 h, reflux.

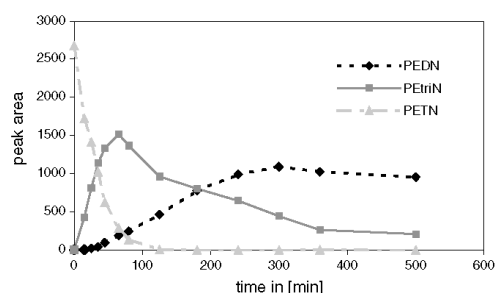
ganic nitrite, nitrogen, nitric oxide, ammonia, and the corresponding alcohol.<sup>7</sup> Monitoring the reaction is advantageous and was accomplished by HPLC-method A.

To prepare PEDN, we used HPLC-method A. We measured the degradation of PETN to PETriN, PEDN, and PEMN (Fig. 2; data from PEMN not shown) and identified a suitable end point after 6.5 h (Fig. 2).

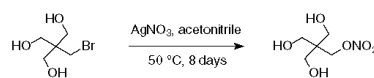
PETriN was obtained after 3 h with a 2-fold excess of hydrazine hydrate. Purification was accomplished by column chromatography.

Reductive degradation was shown to be less advantageous for the preparation of pentaerythrityl mononitrate (PEMN), 1,2-glyceryl dinitrate (1,2-GDN), 1,3-glyceryl dinitrate (1,3-GDN), and 1-glyceryl mononitrate (1-GMN). We preferred reacting the corresponding bromides with silver nitrate in acetonitrile (Schemes 2 and 3) and, if necessary, using a 'fractionated extraction' to remove byproducts. This procedure resulted in purer compounds and higher yields than did purification by column chromatography. Progress of the reaction was monitored using the HPLC-method B for GDN.

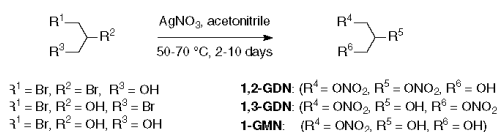
A 4-step synthesis of 2-GMN was performed by acetylation of dihydroxy acetone, reduction of 1, and nitration



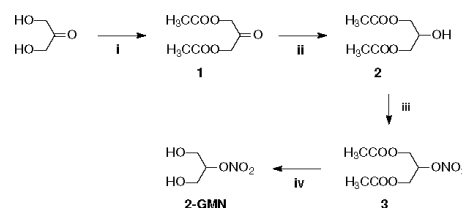
**Figure 2.** Synthesis of PEDN by reductive degradation with an 8-fold excess of hydrazine hydrate, monitored by HPLC.



**Scheme 2.** Synthesis of PEMN.



**Scheme 3.** Synthesis of 1,3-GDN, 1,2-GDN, and 1-GMN.



**Scheme 4.** Synthesis of 2-GMN. Reagents and conditions: (i) pyridine, acetic anhydride, 1.5 h, rt, lit.<sup>11</sup>; (ii)  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ , THF, 7 h,  $3$  °C; (iii) urea, nitric acid (100%), acetic anhydride, 12 h,  $3$  °C; (iv) sodium hydroxide, dichloromethane, 7 min, rt.

of **2** with fuming nitric acid in the presence of acetic anhydride. After hydrolysis of **3** with sodium hydroxide, 2-GMN was obtained initially together with ~30% 1-GMN. The isomerization of 2-GMN to 1-GMN under basic conditions has been already described by Capellos et al.<sup>8</sup> and was explained by a higher stability of the  $\text{ONO}_2$ -group in position 1. Less basic conditions and shorter reaction times resulted in higher yields of 2-GMN (Scheme 4). Chemical protocols are given in reference.<sup>13–24</sup>

As described previously,<sup>2</sup> organ bath experiments were performed using  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -precontracted porcine pulmonary arteries. The vasorelaxant responses of PETN, GTN, the synthesized bioactive of metabolites, and of compound **3** are given in Table 1.

**Table 1.** Concentration response curves and vasodilatory effects ( $\text{EC}_{50}$ -values) of PETN and GTN, their active metabolites, and compound (**3**)

Compound	$\text{EC}_{50}^a$ (nM)
PETN	7 <sup>*</sup>
PETriN	30 <sup>*</sup>
PEDN	2100 <sup>*</sup>
PEMN	72,000 <sup>*</sup>
GTN	27 <sup>*</sup>
1,3-GDN	523
1,2-GDN	1930
1-GMN	56,300
2-GMN	115,000
<b>3</b>	1230

<sup>a</sup> Values are means of three to nine experiments.

<sup>\*</sup> Taken from a previous publication.<sup>3</sup>

Table 1 demonstrates that the vasodilator potencies of PETN, GTN, and their metabolites correlate with the number of nitrate groups. But the decrease of potency is more than a stoichiometric one and previous investigations have shown that not only the number of nitrate groups; but also the 'nitrate carriers' structure significantly influences the vasorelaxant activity.<sup>2</sup> Here too, acetylation of the mononitrate 2-GMN to the mononitrate 3 enhances the vasodilator potency dramatically. Furthermore, quite significant differences in vasodilator potency were found between the isomeric 1,3-GDN and 1,2-GDN and between 1-GMN and 2-GMN, respectively. In general, a terminal location of the nitrate group (1,3-GDN, 1-GMN vs 1,2-GDN, 2-GMN) increases the vasoactivity. We conclude that these differences in vasorelaxant potency are due to different affinities and reactivities toward the nitrate bioactivating enzymes. After all it should be mentioned that the in vitro results given in Table 1 are not simply transmittable to the in vivo situation due to very different bioavailabilities of the compounds. For example, the clinical dosages of PETN have to be ~80-fold higher than those of GTN, although PETN is superior to GTN in vitro (Table 1).<sup>3</sup>

#### Supplementary data

Spectral data of the synthesized compounds (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, and IR). Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmcl.2008.04.057.

#### References and notes

1. Konter, J.; Moellmann, U.; Lehmann, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8294.
2. Koenig, A.; Roegler, C.; Lange, K.; Daiber, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5881.
3. Koenig, A.; Lange, K.; Konter, J.; Daiber, A.; Stalleicken, D.; Glusa, E.; Lehmann, J. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2007**, *5*, 68.
4. Weber, W.; Michaelis, K.; Luckow, V.; Kuntze, U.; Stalleicken, D. *Arzneim.-Forsch.* **1995**, *45*, 781.
5. Boschan, R.; Merrow, R. T.; Van Dolah, R. W. *Chem. Rev.* **1955**, *55*, 485.
6. Berthmann, A.; Ratz, H. In *Houben-Weyl – Methoden Houben-Weyl—Methoden der Organischen Chemie*; Bayer, E., Berthmann, A., Hausweiler, A., Eds.; Stuttgart: Thieme, 1963; *6*, p 329.
7. Merrow, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 1297.
8. Capellos, C.; Fisco, W. J.; Ribaud, C.; Hogan, V. D.; Campisi, J.; Murphy, F. X.; Castorina, T. C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1982**, *14*, 903.
9. Brandstaetter-Kuhnert, M.; Kuhnert, G. *Sci. Pharm.* **1960**, *28*, 287.
10. Korolev, A. M.; Eremenko, L. T.; Meshikhina, L. V. *Russ. Chem. Bull.* **2002**, *51*, 2306, (Translation of *Izv. Akad. Nauk, Ser. Khim.* **2002**, *51*, 2141).
11. Bentley, P. H.; McCrae, W. J. *Org. Chem.* **1970**, *35*, 2082.
12. Hess, U. U.S. Patent 6180664, 1997, 10.
13. *HPLC-methods*: (A) column: Chromolith® Performance RP-18 100 to 4.6 mm (5 µm); eluent: methanol/water 1:1; flow: 0.3 mL/min (isocratic); detection: UV, 215 nm; retention factors: 22.3 min PETN; 13.5 min PETriN; 7.6 min PEDN; 5.8 min PEMN. (B) column: Chromolith® Performance RP-18 100 to 4.6 mm (5 µm); eluent: methanol/water 30:70; flow: 0.3 mL/min (isocratic); detection: UV, 215 nm; retention factors: 11.7 min 1,3-GDN; 16.8 min 1,2-GDN.
14. *Pentaerythrityl tetranitrate (PETN)*: Pentaerythritol (0.50 g, 3.67 mmol) was dissolved dropwise under stirring in 2 mL of concentrated nitric acid (100%) at –5 to –10 °C. After 2–3 h 1 mL of water was added and the mixture maintained for 2 more hours. The voluminous white precipitate was filtered off, washed carefully with water, dissolved in 20 mL of acetone, and filtered again. The filtrate was diluted with 20 mL of water and the acetone cautiously evaporated. The white precipitate was separated and dried in a desiccator under reduced pressure. Yield 0.51 g (44%), white solid, mp 142.2 °C (lit.<sup>9</sup> 142 °C). Anal. (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>) C, H, N.
15. *Pentaerythrityl trinitrate (PETriN)*: Similarly to Hess<sup>12</sup> pentaerythrityl tetranitrate (2.25 g, 7.12 mmol) was dissolved under stirring in a boiling mixture of 50 mL of dioxane and 50 mL of ethanol. Hydrazine hydrate (0.72 g, 14.4 mmol) in 30 mL of water was added dropwise to the stirred solution over 1 h. The mixture was refluxed for 2 h and cooled to room temperature. The progress of the reaction was monitored with HPLC-method A. The solution was diluted with 100 mL of water and extracted with 6× 50 mL of dichloromethane. The combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>) and evaporated. The crude oil was purified by column chromatography on silica gel using hexane/ethylacetate (40:60) as eluent and obtained as a light yellow oil. Yield 0.98 g (51%), light yellow oil. Anal. (C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) C, H, N.
16. *Pentaerythrityl dinitrate (PEDN)*: Similarly to Hess<sup>12</sup> pentaerythrityl tetranitrate (2.43 g, 7.69 mmol) was dissolved under stirring in a boiling mixture of 50 mL of dioxane and 50 mL of ethanol. Hydrazine hydrate (3.09 g, 61.7 mmol) in 30 mL of water was added dropwise under stirring for over 1.5 h. The mixture was refluxed for further 5 h and then cooled to room temperature. The progress of the reaction was monitored with HPLC-method A. The solution was diluted with 100 mL of water and extracted with 6× 50 mL of ethylacetate. The combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>) and evaporated, and the resulting oil was purified by column chromatography on silica gel using hexane/ethylacetate (40:60) as eluent. Yield 0.75 g (43%), light yellow oil, later crystallizing to a light yellow solid. Anal. (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ×  $\frac{1}{2}$  ethylacetate) C, H, N.
17. *Pentaerythrityl mononitrate (PEMN)*: A solution of 2-bromomethyl-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (6.61 g, 33.2 mmol) and silver nitrate (12.41 g, 73.0 mmol) in 50 mL of dry acetonitrile was heated at 50 °C under stirring and protection from light. The precipitated silver bromide was filtered off repeatedly. After 8 days the mixture was cooled to room temperature and saturated sodium chloride solution was added. The filtrate of this mixture was extracted with 10×100 mL of ethylacetate. The combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>) and evaporated. One hundred microliters of water was added and the mixture extracted with 3× 100 mL of *n*-hexane, 4× 100 mL of diethylether, 4× 100 mL of dichloromethane, and 6× 100 mL of ethylacetate. The *n*-hexane, diethylether and dichloromethane phases were discarded and the ethylacetate phases were analyzed for byproducts by HPLC. The pure ethylacetate phases were combined, dried (MgSO<sub>4</sub>), and evaporated. The remaining precipitated white solid was recrystallized from diethylether. Yield

- 1.35 g (22%), white solid, mp 78 °C (lit.<sup>10</sup> 78–79 °C). Anal. (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>6</sub>) C, H, N.
18. Glyceryl trinitrate (GTN) was purchased from Merck, Darmstadt, Germany.
19. *1,3-Glyceryl dinitrate (1,3-GDN)*: A solution of 1,3-dibromo-2-propanol (0.51 g, 2.3 mmol) and silver nitrate (1.42 g, 8.4 mmol) in 8 mL of dry acetonitrile was heated at 50 °C for 7 days under stirring and protection from light. The precipitated silver bromide was separated repeatedly. Progress of the reaction was monitored with HPLC-method B. The solution was then cooled to room temperature and saturated sodium chloride solution was added repeatedly. The precipitated silver chloride and silver bromide were removed and the filtrate was extracted with 3 × 100 mL of chloroform. The combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>) and evaporated to give 1,3-dinitrooxy-2-propanol as a light yellow oil. Yield: 0.40 g (94%). Anal. (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) C, H, N.
20. *1,2-Glyceryl dinitrate (1,2-GDN)*: Prepared as described above for 1,3-GDN from 2,3-dibromo-1-propanol (1.00 g, 4.6 mmol) and silver nitrate (7.80 g, 45.9 mmol) for 2 days. Extraction with 6 × 100 mL of ethylacetate. The crude oily product was diluted with 60 mL of water and extracted with 3 × 60 mL of *n*-hexane and 4 × 60 mL of diethylether. The *n*-hexane phases were discarded and the diethylether phases were analyzed for byproducts with HPLC-method B. The pure diethylether phases were combined, dried (MgSO<sub>4</sub>), and evaporated. Yield: 0.51 g (61%), colorless oil. Anal. (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) C, H, N.
21. *1-Glyceryl mononitrate (1-GMN)*: Prepared as described above from 3-bromo-1,2-propanediol (1.00 g, 6.5 mmol) and silver nitrate (1.96 g, 11.6 mmol) in 12 mL of dry acetonitrile, 70 °C for 10 days. Extraction with 4 × 60 mL of ethylacetate, the combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>), evaporated, the crude oily product was diluted with 80 mL of water and extracted with 3 × 80 mL of *n*-hexane, 3 × 80 mL of diethylether, 3 × 80 mL of dichloromethane and 5 × 80 mL of ethylacetate. The hexane, diethylether, and dichloromethane phases were discarded. The pure ethylacetate phases were combined, dried (MgSO<sub>4</sub>), and evaporated. Yield: 0.33 g (37%), light yellow oil. Anal. (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>5</sub> ×  $\frac{3}{11}$  water ×  $\frac{22}{27}$  ethylacetate) C, H, N.
22. *Glyceryl 1,3 diacetate (2)*: 1 M-BH<sub>3</sub> \* THF (3.40 mL, 3.40 mmol) was added dropwise under nitrogen and stirring to 1,3-dihydroxypropane-2-one 1,3 diacetate (**1**) (0.25 g, 1.44 mmol), synthesized as described previously,<sup>11</sup> in 4 mL of dry THF for over 7 h at 3 °C (monitoring by GC/MS). The mixture was diluted with 30 mL of water, extracted with 3 × 20 mL of chloroform, and the combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>) and evaporated. Yield: 0.085 g (34%), colorless oil. Anal. (C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>) C, H, N.
23. *2-Glyceryl mononitrate 1,3 diacetate (3)*: A solution of (**2**) (0.50 g, 2.84 mmol) and urea (0.004 g, 0.067 mmol) in 15 mL of dichloromethane was cooled to 3 °C and concentrated nitric acid (100%) (0.36 g, 5.70 mmol) was added dropwise at <10 °C under stirring. After cooling to 3 °C, acetic anhydride (0.58 g, 5.70 mmol) was added dropwise at <10 °C, the mixture stirred overnight at room temperature and then diluted with 20 mL of water. The organic phase was separated and washed once with 30 mL of water and 30 mL of saturated sodium bicarbonate solution and twice with 30 mL of water. The organic phase was dried (MgSO<sub>4</sub>) and evaporated. Yield: 0.60 g (96%), colorless oil. Anal. (C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>7</sub>) C, H, N.
24. *(2-GMN)*: A solution of sodium hydroxide (0.13 g, 3.25 mmol) in 0.19 mL of water was added dropwise under stirring to 1,3-dihydroxy-2-nitrooxypropane 1,3 diacetate (0.37 g, 1.67 mmol) dissolved in 2.4 mL of dichloromethane. The mixture was maintained for 7 more minutes, then neutralized with concentrated hydrochloric acid; and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with 3 × 10 mL of diethylether and the combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>) and evaporated. Yield: 0.12 g (53%), light yellow oil. Anal. (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>5</sub>) C, H, N.

## Publikation 4

### **A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena.**

Schuhmacher, Swenja; Schulz, Eberhard; Oelze, Matthias; König, Andreas;  
Roegler, Carolin; Lange, Kathrin; Sydow, Luise; Kawamoto, Toshihiro; Wenzel,  
Philipp; Münzel, Thomas; Lehmann, Jochen; Daiber, Andreas.

*British Journal of Pharmacology* **2009**, 158, 510-20.

Veröffentlichung 4 befasst sich mit der Bioaktivierung und Toleranzentwicklung von zwei organischen Aminoalkylnitraten. Das hochpotente Mononitrat AEN wird unabhängig von der ALDH-2 bioaktiviert, zeigt keine *in vitro* Toleranz und auch keine Induktion von oxidativem Stress. Im Gegensatz dazu bioaktiviert die ALDH-2 das schwach wirksame Trinitrat TEAN, welches sowohl Toleranz als auch die Entstehung oxidativen Stresses induziert. Aminoalkylnitrate scheinen eine neue Klasse von organischen Nitraten zu sein.

**Eigenanteil:** Synthese und Charakterisierung des organischen Trinitrats TEAN, Voruntersuchungen hinsichtlich der Vasorelaxation, Mitwirkung an der Erstellung des Manuskripts.





## RESEARCH PAPER

## A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena

S Schuhmacher<sup>1\*</sup>, E Schulz<sup>1\*</sup>, M Oelze<sup>1</sup>, A König<sup>2</sup>, C Roegler<sup>2</sup>, K Lange<sup>2</sup>, L Sydow<sup>1</sup>, T Kawamoto<sup>3</sup>, P Wenzel<sup>1</sup>, T Münzel<sup>1</sup>, J Lehmann<sup>2</sup> and A Daiber<sup>1</sup>

<sup>1</sup>II. Medizinische Klinik, Labor für Molekulare Kardiologie, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, Germany, <sup>2</sup>Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für pharmazeutische/medizinische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Germany and

<sup>3</sup>Department of Environmental Health, University of Occupational and Environmental Health, Iseigaoka 1-1, Yahatanishi, Kitakyushu, Japan

**Background and purpose:** The chronic use of organic nitrates is limited by serious side effects including oxidative stress, nitrate tolerance and/or endothelial dysfunction. The side effects and potency of nitroglycerine depend on mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2). We sought to determine whether this concept can be extended to a new class of organic nitrates with amino moieties (aminoalkyl nitrates).

**Experimental approach:** Vasodilator potency of the organic nitrates, *in vitro* tolerance and *in vivo* tolerance (after continuous infusion for 3 days) were assessed in wild-type and ALDH-2 knockout mice by isometric tension studies. Mitochondrial oxidative stress was analysed by L-012-dependent chemiluminescence and protein tyrosine nitration.

**Key results:** Aminoethyl nitrate (AEN) showed an almost similar potency to glyceryl trinitrate (GTN), even though it is only a mononitrate. AEN-dependent vasodilatation was mediated by cGMP and nitric oxide. In contrast to triethanolamine trinitrate (TEAN) and GTN, AEN bioactivation did not depend on ALDH-2 and caused no *in vitro* tolerance. *In vivo* treatment with TEAN and GTN, but not with AEN, induced cross-tolerance to acetylcholine (ACh)-dependent and GTN-dependent relaxation. Although all nitrates tested induced tolerance to themselves, only TEAN and GTN significantly increased mitochondrial oxidative stress *in vitro* and *in vivo*.

**Conclusions and implications:** The present results demonstrate that not all high potency nitrates are bioactivated by ALDH-2 and that high potency of a given nitrate is not necessarily associated with induction of oxidative stress or nitrate tolerance. Obviously, there are distinct pathways for bioactivation of organic nitrates, which for AEN may involve xanthine oxidoreductase rather than P450 enzymes.

British Journal of Pharmacology (2009) 158, 510–520; doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00303.x; published online 25 June 2009

This Research Paper is the subject of a Commentary in this issue by Bauersachs (pp. 507–509). To view this article visit <http://www3.interscience.wiley.com/journal/121548564/issueyear?year=2009>

**Keywords:** organic nitrates; bioactivation; mitochondrial aldehyde dehydrogenase; mitochondrial oxidative stress; vascular function

**Abbreviations:** ACh, acetylcholine; AEN, aminoethyl nitrate; ALDH-2, mitochondrial aldehyde dehydrogenase; ALDH-2<sup>-/-</sup>, ALDH-2 knockout; DMSO, dimethyl sulphoxide; ECL, enhanced chemiluminescence; GTN, glycerol trinitrate (nitroglycerin); NPME, methyl-3-nitrooxypropanoate; IPM, iso-propyl nitrate; ISDN, isosorbide dinitrate; ISMN, isosorbide-5-mononitrate; L-012, 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H)dione sodium salt; L-NAME, N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; NO, nitric oxide; NS2028, 4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo[3,4-d]benz[b][1,4]oxazin-1-one; PBS, phosphate buffered saline; PETN, pentaerythritol tetranitrate; PETriN, pentaerythritol trinitrate; PTIO, 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide; ROS, reactive oxygen species; TEAN, triethanolamine trinitrate

Correspondence: Dr A Daiber, Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, II. Medizinische Klinik – Labor für Molekulare Kardiologie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung – Raum 00349, Obere Zahlbacher Str. 63, 55101 Mainz, Germany. E-mail: daiber@uni-mainz.de

\*S.S. and E.S. contributed equally to this study and should therefore both be considered as first authors.

Received 5 December 2008; revised 16 February 2009; accepted 16 March 2009

## Introduction

A central constituent of the regulatory instruments of the vascular system is the synthesis of the endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide (NO), which is a potent vasodilator and also represents an anti-aggregatory signal (Arnold *et al.*, 1977; Palmer *et al.*, 1987; Radomski *et al.*, 1987). Endothelial dysfunction has been identified as a hall-mark of most cardiovascular diseases (Cai and Harrison, 2000) and is always associated with vascular oxidative stress, decreased NO bioavailability and/or impaired activity (uncoupling) of endothelial NO synthase (Munzel *et al.*, 2005b; Forstermann and Munzel, 2006). Vice versa, it was demonstrated that patients with an impaired endothelial function have a higher risk of cardiovascular events (Schachinger *et al.*, 2000; Heitzer *et al.*, 2001). Endothelial dysfunction of coronary arteries is associated with an increased risk of myocardial infarction (Schachinger *et al.*, 2000) because dysfunctional vessels are prone to atherosclerosis and thrombus formation (Wennmalm, 1994).

Therefore, NO substitution seemed to be an attractive pharmacological strategy to overcome endothelial (vascular) dysfunction in the setting of cardiovascular diseases (Anderson *et al.*, 1994; Abrams, 1996). Organic nitrates [such as nitroglycerine/glycerol trinitrate (GTN) and isosorbide-5-mononitrate (ISMN)] are the most prominent representatives of this pharmacological class of vasodilators (Gryglewski *et al.*, 1992). Unfortunately, the chronic use of these drugs is limited by serious side effects such as nitrate tolerance, a phenomenon which is not only associated with the loss of vasodilator potency of these drugs but also with the induction of vascular oxidative stress resulting in endothelial and vascular dysfunction (Munzel *et al.*, 2005a; Daiber *et al.*, 2008).

During the last two decades, many efforts have been made to identify the mechanisms underlying clinical nitrate tolerance and endothelial dysfunction in response to chronic organic nitrate treatment (Munzel *et al.*, 2005a; Daiber *et al.*, 2008). The 'oxidative stress concept in nitrate tolerance' was established (Munzel *et al.*, 1995) and further refined by identifying mitochondrial reactive oxygen and nitrogen species formation as a key event for the development of nitrate tolerance and endothelial dysfunction (Sydow *et al.*, 2004; Daiber *et al.*, 2005; Esplugues *et al.*, 2006). The identification of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) as an organic nitrate reductase (Chen *et al.*, 2002; 2005; Sydow *et al.*, 2004; Wenzel *et al.*, 2007b) revived the Needleman 'thiol depletion concept in nitrate tolerance'. This concept was further substantiated by the alleviation of nitrate tolerance by the dithiol dihydrolipoic acid, an essential co-factor for ALDH-2 nitrate reductase activity (Jakschik and Needleman, 1973; Wenzel *et al.*, 2007a).

In previous studies, we have demonstrated that organic nitrate potency correlates with the number of nitrate groups and that high potency nitrates with  $pD_2$ -values  $>6$  [pentaerithrityl tetranitrate (PETN), GTN and pentaerithrityl trinitrate (PETriN)] are bioactivated by ALDH-2 (Daiber *et al.*, 2004; Koenig *et al.*, 2007a; Wenzel *et al.*, 2007b). However, this concept was recently challenged when the mononitrate 2-aminoethyl nitrate (AEN) was found to be a highly potent organic nitrate with a calculated  $pD_2$ -value of 7.5 in this study (for comparison the  $pD_2$ -value of GTN was 7.44) (Koenig *et al.*,

2007b). In the present study we sought to determine whether bioactivation of this new class of high potency mononitrates involves ALDH-2, whether AEN induces *in vitro* and *in vivo* tolerance or cross-tolerance to other vasodilators and, finally, whether AEN in comparison with triethanolamine trinitrate (TEAN) and methyl-3-nitrooxypropionate (NPME) leads to increased mitochondrial oxidative stress and protein tyrosine nitration.

## Methods

### Animals and in vivo treatment

Young adult ( $8 \pm 2$  weeks) male ALDH-2 knockout (ALDH-2<sup>-/-</sup>) mice were age-matched with C57Bl6 mice. The generation of the ALDH-2 null mutant was as described elsewhere (Kitagawa *et al.*, 2000). Mice were equipped with micro osmotic pumps from Alzet (Cupertino, CA, USA) containing 450 mM GTN solved in ethanol ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$  for 3 days) or ethanol as a control. Mice were also treated *in vivo* with the mononitrate AEN or the trinitrate TEAN by implanted micro osmotic pumps containing 1 M AEN ( $150 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$  for 3 days) or 500 mM TEAN dissolved in dimethyl sulphoxide ( $140 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$  for 3 days). All animal treatment was in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the US National Institutes of Health and was granted by the Ethics Committee of the University Hospital Mainz.

### Isometric tension studies

Vasodilator responses to acetylcholine (ACh), AEN, TEAN, NPME and nitroglycerine (GTN) were assessed with endothelium-intact isolated murine aortic rings mounted for isometric tension recordings in organ chambers and pre-constricted with prostaglandin  $F_{2\alpha}$  as described previously (Wenzel *et al.*, 2007b). To avoid development of tachyphylaxis, the potency of organic nitrates was not assessed in two sequential concentration-relaxation response curves. However, for some experiments we induced tachyphylaxis (*in vitro* tolerance) by performing two sequential concentration-relaxation response curves (Koenig *et al.*, 2007b) resulting in a challenge of the isolated vessel with the  $EC_{70}$  concentration of the organic nitrate ( $100 \mu\text{M}$  for AEN and  $1 \text{ mM}$  for TEAN). AEN potency was also determined in aortic ring segments after pre-incubation with NS2028 (4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo[3,4-d]benz[b][1,4]oxazin-1-one;  $3 \mu\text{M}$ ), 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO) ( $10 \mu\text{M}$ ), miconazol ( $25 \mu\text{M}$ ), benomyl ( $10 \mu\text{M}$ ), allopurinol ( $100 \mu\text{M}$ ) and L-NAME ( $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride;  $200 \mu\text{M}$ ) for 30 min.

### Mitochondrial reactive oxygen species formation

Isolated mitochondria were prepared from mice hearts according to a previously published protocol and reactive oxygen species (ROS) formation was detected by L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H)dione sodium salt;  $100 \mu\text{M}$ ) enhanced chemiluminescence as recently described (Raha *et al.*, 2000; Daiber *et al.*, 2005). Briefly, hearts were glass/glass homogenized in HEPES buffer



and subjected to centrifugation steps at 4°C of 1500× *g* for 10 min and 2000× *g* for 5 min (the pellets were discarded). The resulting supernatant was centrifuged at 20 000× *g* for 20 min, and the pellet resuspended in 1 mL of Tris buffer. The last centrifugation step was repeated and the pellet was finally resuspended in 1 mL of Tris buffer and the protein content was determined by the Lowry method. Mitochondrial suspensions were diluted to a final protein concentration of 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> in 0.5 mL of phosphate buffered saline (PBS) buffer containing L-012 (100 µM). ROS production was detected after stimulation with succinate (5 mM). The effect of AEN, TEAN, NPME, isopropyl nitrate (IPM) and GTN (10 and 1000 µM) on ROS formation was tested. The chemiluminescence was registered at intervals of 30 s over 5 min with a luminometer and the signal was expressed as counts min<sup>-1</sup> at 5 min.

#### Detection of 3-nitrotyrosine by dot blot analysis

Cardiac mitochondria (0.2 mg·mL<sup>-1</sup> total protein) were incubated with organic nitrates (5 mM) or GTN (50–5000 µM) for 1 h at 37°C. Soluble fractions of these samples (dissolved in Tween) were transferred to a nitrocellulose membrane as previously described (Dalber *et al.*, 2003). Briefly, 100 µL (0.2 µg·µL<sup>-1</sup> protein based on Bradford analysis) of the sample was transferred to a Protran BA85 (0.45 µm) nitrocellulose membrane by a Minifold I vacuum Dot-Blot system. Each slot was washed with 250 µL PBS and the membrane was dried for 15 min at 60°C. For detection of nitrated protein, a mouse monoclonal 3-NT antibody was used at a dilution of 1:1000. Positive bands were detected by enhanced chemiluminescence after incubation with a peroxidase-coupled secondary antibody (GAM-POX, 1:5000). All incubation and washing steps were performed according to the manufacturer's instructions. Densitometric quantification was performed by using a high-resolution scanner (Biometra/Epson) equipped with densitometry software Gel Pro Analyser (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

#### Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA (with Bonferroni's or Dunn's correction for comparison of multiple means) was used for comparisons of vasodilator potency and efficacy and L-012-derived chemiluminescence. The EC<sub>50</sub> value for each experiment was obtained by log-transformation. *P* values < 0.05 were considered significant.

#### Chemicals and reagents

For isometric tension studies, GTN was used from a Nitrolin-gual infusion solution (1 mg·mL<sup>-1</sup>) from G. Pohl-Boskamp (Hohenlockstedt, Germany). For induction of *in vivo* tolerance, GTN was used from a solution in ethanol (102 g·L<sup>-1</sup>) from UNIKEM (Copenhagen, Denmark). Prostaglandin F<sub>2α</sub> was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). L-012 was purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). The organic nitrates were synthesized as previously described (Koenig *et al.*, 2007b). 2-Nitrooxyethylammoniumnitrate (AEN) from 2-aminoethanol (Ishihara *et al.*, 2003), TEAN from triethanolamine, NPME

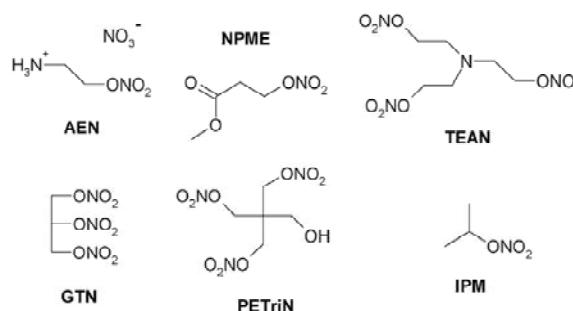
from methyl 3-hydroxypropionoate (McCallum and Emmons, 1956) and IPM was purchased from Sigma-Aldrich. All other chemicals were of analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich, Fluka or Merck.

The luminometer was obtained from Berthold Techn. (Bad Wildbad, Germany); nitrocellulose membrane and Minifold I vacuum Dot-Blot system, Schleicher & Schuell (Dassel, Germany); mouse monoclonal 3-NT antibody, Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA); peroxidase-coupled secondary antibody (GAM-POX, 1:5000), Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

## Results

#### Potency of organic nitrates in ALDH-2-deficient mice and induction of tachyphylaxis (*in vitro* tolerance)

Figure 1 shows the chemical structure of all organic nitrates that were tested in the present study. The mononitrate AEN showed an unusually high potency (EC<sub>50</sub> = 0.83 µM, Table 1 and Figure 2A), which was superior to ISMN [EC<sub>50</sub> = 2.45 mM (Wenzel *et al.*, 2007b)] and almost reached the potency of GTN (EC<sub>50</sub> = 0.10 µM) in murine aorta (see Table 2 and Figure 2G). Even more surprisingly, the potency of AEN was not significantly altered in ALDH-2-deficient mice indicating that bioactivation by ALDH-2 was not involved in the vasodilatation induced by this nitrate (Figure 2A). In addition, AEN only induced mild but not significant tachyphylaxis, as measured by the second of two identical concentration–relaxation response curves resulting from a cumulative pre-incubation of the vessel with the EC<sub>70</sub> of AEN, 100 µM (Figure 2B). In contrast, the trinitrate TEAN was clearly less potent as compared with AEN or GTN (EC<sub>50</sub> = 15 µM, Table 1 and Figure 2C and G) and showed a significantly impaired potency in ALDH-2-deficient mice, suggesting the mitochondrial bioactivation pathway has a partial role in the response to this nitrate. Challenge of murine aortic segments with the EC<sub>70</sub> of TEAN 1 mM resulted in a severe and significant shift to the right of the subsequent concentration–relaxation response curves in wild-type and ALDH-2 knockout mice (Figure 2D), compatible with the development of profound tachyphylaxis (*in vitro* tolerance). Interestingly, the potency of TEAN in the tachyphylactic rings was reduced to a similar degree in wild-type and



**Figure 1** Structures of the organic nitrates used in this study. 2-Nitrooxyethylammoniumnitrate (AEN), methyl-3-nitrooxypropionate (NPME) triethanolamine trinitrate (TEAN), glyceryl trinitrate (GTN), pentaerythritol trinitrate (PETriN) and isopropyl nitrate (IPM).

**Table 1** Potencies and efficacies of organic nitrates in aorta from wild-type and ALDH-2<sup>-/-</sup> mice

AEN			2nd AEN (tachyphylaxis)	
Group	Potency (pD <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>	Efficacy (%) <sup>a</sup>	Potency (pD <sub>2</sub> )	Efficacy (%)
Wild-type	6.08 ± 0.10 (n = 20)	81 ± 4 (n = 20)	5.87 ± 0.09 (n = 16)	77 ± 2 (n = 16)
ALDH-2 <sup>-/-</sup>	5.85 ± 0.11 (n = 20)	75 ± 2 (n = 20)	5.68 ± 0.12 (n = 16)	71 ± 5 (n = 16)
TEAN			2nd TEAN (tachyphylaxis)	
Group	Potency (pD <sub>2</sub> )	Efficacy (%)	Potency (pD <sub>2</sub> )	Efficacy (%)
Wild-type	4.82 ± 0.12 <sup>‡</sup> (n = 20)	71 ± 4 (n = 20)	3.69 ± 0.12 <sup>‡</sup> (n = 16)	58 ± 8 (n = 16)
ALDH-2 <sup>-/-</sup>	4.22 ± 0.12 <sup>‡</sup> (n = 15)*	69 ± 3 (n = 15)	3.78 ± 0.11 (n = 16)	48 ± 4 <sup>‡</sup> (n = 16)
NPME			2nd NPME (tachyphylaxis)	
Group	Potency (pD <sub>2</sub> )	Efficacy (%)	Potency (pD <sub>2</sub> )	Efficacy (%)
Wild-type	4.69 ± 0.13 <sup>‡</sup> (n = 30)	68 ± 3 <sup>‡</sup> (n = 30)	4.47 ± 0.17 <sup>‡</sup> (n = 16)	75 ± 2 <sup>‡</sup> (n = 16)
ALDH-2 <sup>-/-</sup>	4.47 ± 0.09 <sup>‡</sup> (n = 25)	63 ± 3 <sup>‡</sup> (n = 25)	4.27 ± 0.12 <sup>‡</sup> (n = 14)	56 ± 3 <sup>‡</sup> (n = 14)

ALDH-2<sup>-/-</sup>, aldehyde dehydrogenase knockout; AEN, aminoethyl nitrate; TEAN, triethanolamine trinitrate; NPME, methyl-3-nitrooxypropanoate.\*P < 0.05 versus wild-type, <sup>‡</sup>P < 0.05 versus first concentration–relaxation response curve, <sup>§</sup>P < 0.05 versus AEN wild-type, <sup>¶</sup>P < 0.05 versus AEN knockout.<sup>a</sup>Potency is –log EC<sub>50</sub> and efficacy is defined as maximal relaxation obtained with the highest concentration of the vasodilator used.

ALDH-2-deficient mice, although it was different in untreated rings, indicating pretreatment with TEAN induced a complete loss of ALDH-2 activity. Finally, the mononitrate NPME showed an almost similar potency (EC<sub>50</sub> = 34 µM, Table 1 and Figure 2E and G) as compared with TEAN and to isosorbide dinitrate (ISDN) [EC<sub>50</sub> = 25 µM (Chen *et al.*, 2005)] which again seemed to be independent of ALDH-2 because NPME potency was not significantly altered in ALDH-2-deficient mice. The mononitrate IPM, which was only used in the present study to assess mitochondrial ROS formation, was reported to have a quite low potency in rat aorta [EC<sub>50</sub> = 437 µM (Koenig *et al.*, 2007b)]. In a subsequent second concentration–relaxation response curve the potency and efficacy of NPME was not significantly changed (Table 1 and Figure 2F) indicating the absence of any relevant tachyphylaxis. However, pretreatment of rings from ALDH-2<sup>-/-</sup> mice with NPME induced a significant shift to the right of the concentration–response curve compared with aortic sections from wild-type mice that were treated in the same way (Figure 2F).

#### Characterization of the AEN-dependent vasodilatation

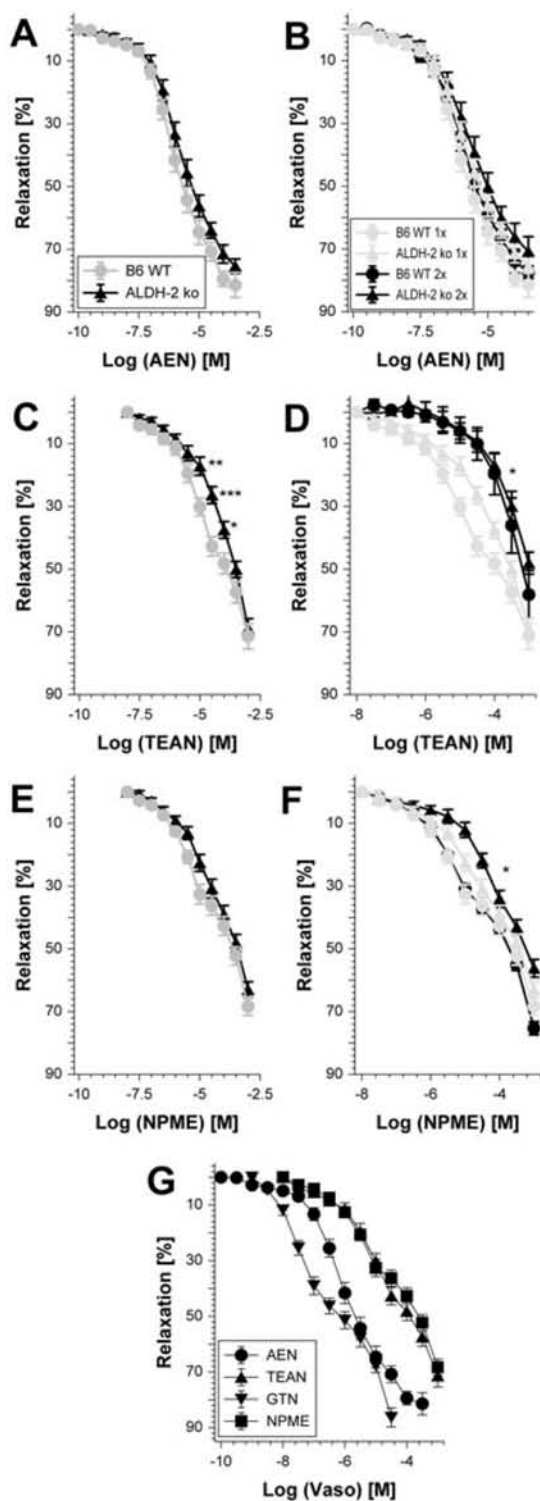
To investigate further the mechanism involved in the relaxation evoked by AEN, isolated aortic ring segments were incubated with different inhibitors that affect distinct vasodilating signalling pathways. Pre-incubation with the inhibitor of soluble guanylyl cyclase NS2028 completely abolished AEN-dependent vasodilatation, whereas the NO scavenger PTIO only partially inhibited this process and the non-specific P450 inhibitor miconazol rather improved than impaired AEN potency (Figure 3A). We also tested the effect of the non-specific ALDH inhibitor benomyl that blocks not only the mitochondrial isoform ALDH-2, but also the cytosolic isoforms ALDH-1 and ALDH-4. As benomyl did not significantly affect the AEN-induced relaxation, the involvement of ALDH enzymes in its bioactivation may be excluded. In addition, L-NAME, an inhibitor of all NOS isoforms, did not significantly alter the AEN potency (Figure 3B). In contrast,

allopurinol, the inhibitor of xanthine oxidoreductase (after conversion to its hydroxylated product oxypurinol) caused a significant impairment of the relaxation to higher concentrations of AEN (Figure 3B).

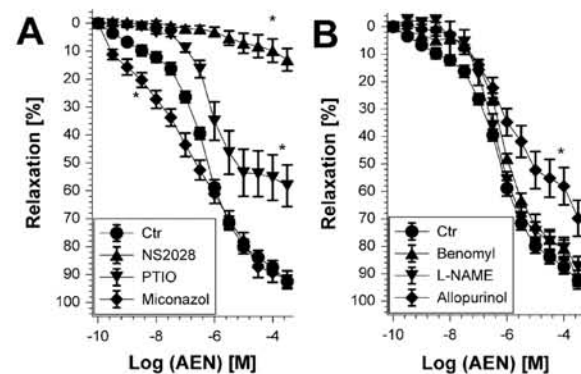
#### Mitochondrial ROS formation and protein tyrosine nitration after *in vitro* treatment with organic nitrates

In isolated heart mitochondria from ALDH-2<sup>-/-</sup> mice, the L-012-derived chemiluminescence signal increased in response to challenge with 1 mM TEAN but not with AEN, NPME or IPM (Figure 4A). A similar pattern was obtained in isolated heart mitochondria from wild-type mice (Figure 4B) and the trinitrate was found to be even more potent than GTN at inducing acute mitochondrial oxidative stress (Daiber *et al.*, 2005; Mollnau *et al.*, 2006). GTN was also identified as a powerful inducer of mitochondrial oxidative stress, whereas another nitrate, PETriN, did not induce mitochondrial ROS formation (Figure 4C). PETriN is the trinitrate metabolite of PETN, which was previously shown to possess antioxidative properties (Daiber *et al.*, 2004). As expected, neither NPME nor AEN induced mitochondrial ROS formation at a concentration of 500 µM. When mitochondria from wild-type and ALDH-2<sup>-/-</sup> mice were directly compared, the pattern of organic nitrate-induced ROS formation was very similar in both groups, indicating that the presence of ALDH-2 does not have an essential role in nitrate-triggered mitochondrial oxidative stress (Figure 4D). Uric acid (50 µM), a scavenger of peroxynitrite-derived free radicals, completely abolished the chemiluminescence signals induced by GTN and TEAN (not shown).

Protein tyrosine nitration is an oxidative amino acid modification resulting from peroxynitrite-derived free radicals or peroxidase-catalysed nitration by nitrite and hydrogen peroxide. When mitochondria were incubated with GTN, the level of nitrated proteins significantly increased in a dose-dependent manner (Figure 5A). Among the nitrates tested, TEAN was the most effective inducer of nitration, while AEN



**Figure 2** Vascular function of organic nitrates in wild-type and ALDH-2<sup>-/-</sup> aortic rings and tachyphylaxis (*in vitro* tolerance). Concentration-relaxation response curves for 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (AEN) (10<sup>-10</sup> to 10<sup>-3.5</sup> M; A and B), triethanolamine trinitrate (TEAN) (10<sup>-7</sup> to 10<sup>-3</sup> M; C and D) and methyl-3-nitrooxypropanoate (NPME) (10<sup>-7</sup> to 10<sup>-3</sup> M; E and F) were obtained by isometric tension recordings in aortic segments from wild-type (B6 WT) and ALDH-2<sup>-/-</sup> (ALDH-2 ko) mice. (A, C and E) Potency of the nitrates was compared in aorta from wild-type and ALDH-2<sup>-/-</sup> mice. (B, D and F) Effect of repeated concentration-relaxation response curves was tested resulting in pre-incubation of the rings with the EC<sub>70</sub> (100  $\mu$ M for AEN, 1 mM for TEAN and NPME). For both strains the first concentration-relaxation response curves and the subsequent are shown. (G) Comparison of the vasodilator potency of AEN, TEAN, glyceryl trinitrate (GTN) and NPME in B6 WT mice. Data are mean  $\pm$  SEM of 14–30 independent experiments with tissue from 8–17 animals per group. \**P* < 0.05 versus WT on the same treatment. For further statistical analysis, see Table 1.



**Figure 3** Effect of different inhibitors on vasodilatation evoked by 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (AEN) in wild-type mice. AEN potency was determined after pre-incubation of isolated aortic ring segments for 30 min with (A) NS2028 (3  $\mu$ M), PTIO (10  $\mu$ M) or miconazol (25  $\mu$ M) and (B) benomyl (10  $\mu$ M), L-NAME (200  $\mu$ M) or allopurinol (100  $\mu$ M). Data are mean  $\pm$  SEM of 6–12 independent experiments with tissue from different mice. \**P* < 0.05 versus control without treatment.

and NPME did not significantly affect 3-nitrotyrosine levels, which was in accordance with the observations made with L-012-enhanced chemiluminescence (Figure 5B).

#### Induction of *in vivo* tolerance and cross-tolerance

Chronic *in vivo* treatment with the mononitrate AEN had no significant effect on the ACh-dependent relaxation, thus excluding the possibility that this compound causes endothelial dysfunction (Table 2 and Figure 6A). In contrast, *in vivo* administration of the trinitrate TEAN induced severe endothelial dysfunction, demonstrated by a significantly impaired efficacy of the endothelium-dependent vasodilator ACh (Table 2 and Figure 6B). Similar observations were made for the GTN concentration-relaxation response curves which were not significantly impaired after treatment with AEN *in vivo* but were inhibited by TEAN *in vivo* therapy, indicating a marked degree of cross-tolerance towards GTN (Table 2, Figure 6C and D). Remarkably, AEN induced a marked tolerance to itself (Table 2 and Figure 6E), which is inconsistent

**Table 2** Potencies and efficacies of organic nitrates in aorta from wild-type mice in response to *in vivo* treatment

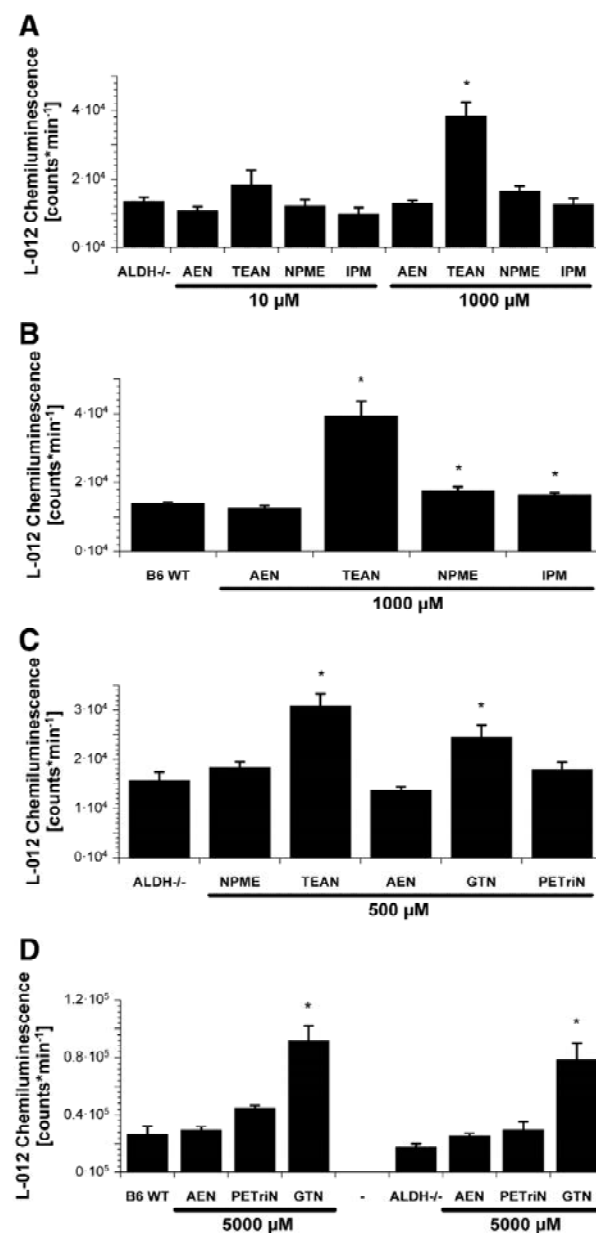
<i>In vivo</i> treatment	ACh		GTN		AEN		TEAN	
	Potency (pD <sub>50</sub> ) <sup>a</sup>	Efficacy (%) <sup>b</sup>	Potency (pD <sub>50</sub> )	Efficacy (%)	Potency (pD <sub>50</sub> )	Efficacy (%)	Potency (pD <sub>50</sub> )	Efficacy (%)
EtOH	6.92 ± 0.12 (n = 14)	65 ± 4 (n = 14)	6.72 ± 0.13 (n = 12)	86 ± 3 (n = 12)	6.41 ± 0.06 (n = 27)	79 ± 3 (n = 27)	4.11 ± 0.09 (n = 5)	79 ± 5 (n = 5)
GTN	6.63 ± 0.09 (n = 18)*	47 ± 4 (n = 18)*	5.95 ± 0.18 (n = 11)*	82 ± 4 (n = 11)*	6.29 ± 0.05 (n = 28)	71 ± 4 (n = 28)	3.75 ± 0.12 (n = 5)	59 ± 4 (n = 5)*
DMSO	7.04 ± 0.05 (n = 12)	60 ± 3 (n = 12)	6.63 ± 0.06 (n = 19)	72 ± 2 (n = 19)	6.13 ± 0.07 (n = 19)	67 ± 4 (n = 19)	—	—
AEN	6.78 ± 0.08 (n = 11)*	53 ± 3 (n = 12)	6.68 ± 0.05 (n = 17)	76 ± 2 (n = 17)	5.50 ± 0.06 (n = 16)*	45 ± 3 (n = 16)*	—	—
DMSO	7.13 ± 0.08 (n = 12)	70 ± 3 (n = 12)	6.57 ± 0.14 (n = 12)	79 ± 4 (n = 12)	—	—	4.81 ± 0.08 (n = 9)	79 ± 2 (n = 9)
TEAN	6.42 ± 0.07 (n = 12)*	45 ± 4 (n = 12)*	5.69 ± 0.05 (n = 12)*	64 ± 7 (n = 12)	—	—	4.48 ± 0.13 (n = 7)*	68 ± 5 (n = 7)

\**P* < 0.05 versus solvent control.<sup>a</sup>Potency is -log EC<sub>50</sub> and efficacy is defined as maximal relaxation obtained with the highest employed concentration of the vasodilator.

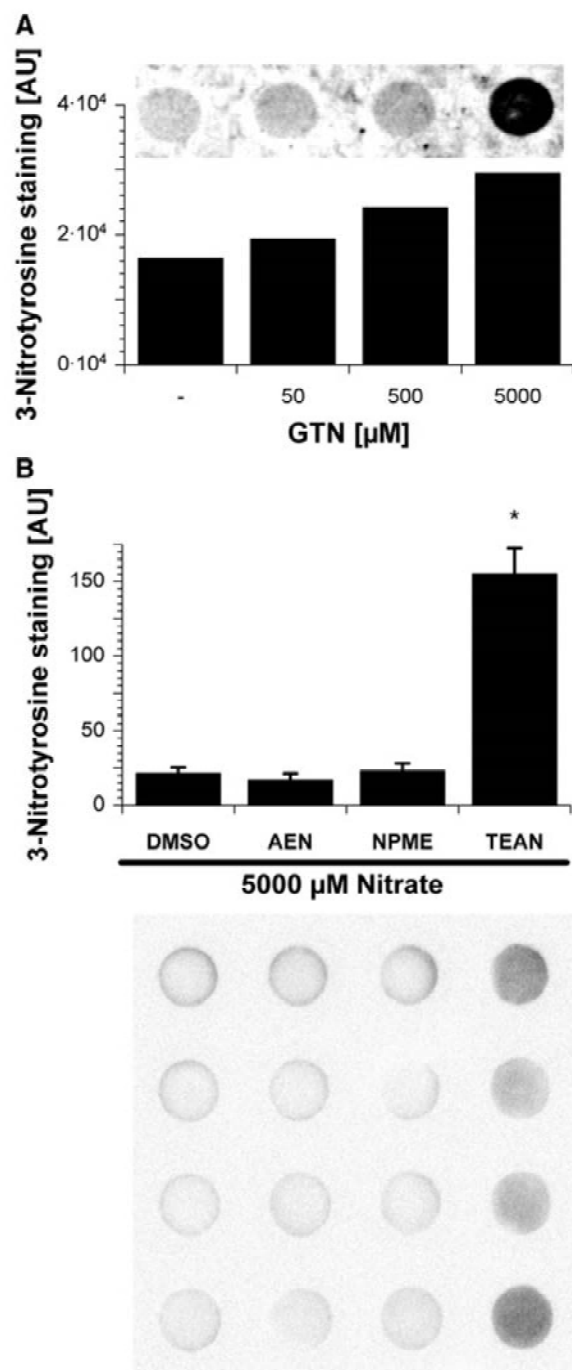
ACh, acetylcholine; AEN, aminoethyl nitrate; GTN, nitroglycerine; DMSO, dimethyl sulphoxide; EtOH, ethanol; TEAN, triethanolamine trinitrate.

Mononitrates, bioactivation and tolerance  
S Schuhmacher et al

515

**Figure 4** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) formation after acute organic nitrate treatment. Isolated cardiac mitochondria (0.1 mg protein mL<sup>-1</sup>) were stimulated with succinate (5 mM), the chemiluminescence signal was detected using a single photon counter in the presence of the dye L-012 (100 µM). The organic nitrates 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (AEN), triethanolamine trinitrate (TEAN), methyl-3-nitrooxypropanoate (NPME) and isopropyl nitrate (IPM) were tested at 10 or 1000 µM in mitochondria from ALDH-2<sup>-/-</sup> (A) or wild-type (WT) (B) mice. ROS formation was also determined for NPME, TEAN, AEN, glyceryl trinitrate (GTN) and pentaerythrityl trinitrate (PETriN) at 500 µM in mitochondria from ALDH-2<sup>-/-</sup> mice (C). Mitochondrial ROS formation in WT versus ALDH-2<sup>-/-</sup> mice was also measured for AEN, PETriN and GTN at 5 mM (D). All nitrates were used from stocks in dimethyl sulphoxide and the vehicle was added to controls. Data are mean ± SEM of 8–24 (A), 6–24 (B), 8 (C) and 4–6 (D) experiments with mitochondria from three to six animals per group. \**P* < 0.05 versus untreated control.





with the observation showing that AEN was devoid of tachyphylaxis and oxidative stress (Figures 2, 4 and 5). The TEAN concentration–relaxation response curve revealed the development of tolerance, because the curve was significantly shifted to the right in aortic ring segments from mice treated with TEAN *in vivo* for 3 days (Figure 6F).

**Figure 5** Nitration of mitochondrial proteins in response to acute organic nitrate treatment. Protein tyrosine nitration was tested in isolated cardiac mitochondria (0.2 mg protein mL<sup>-1</sup>) from control mice for glyceryl trinitrate (GTN) (5–5000 μM) (A) and 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (AEN), methyl-3-nitrooxypropionate (NPME), triethanolamine trinitrate (TEAN) (5 mM) (B). 3-Nitrotyrosine formation was detected by dot blot analysis using a specific antibody. Dimethyl sulphoxide (DMSO) was used as a solvent control for AEN, NPME and TEAN whereas ethanol (EtOH) was used for GTN respectively; 20 μg of protein was transferred to each well. Below the densitometric quantification the original blot is shown. Data shown in (B) are mean ± SEM of eight independent experiments. \**P* < 0.05 versus DMSO solvent control.

*In vivo* treatment with GTN resulted in severe impairment of endothelium-dependent relaxation (ACh response) and of course tolerance to itself (Table 2, Figure 7A and B). AEN *in vivo* therapy did not induce cross-tolerance towards GTN (Figure 6C) and vice versa GTN *in vivo* treatment did not trigger cross-tolerance towards AEN (Table 2 and Figure 7C). In accordance with the observation that *in vivo* administration of TEAN caused cross-tolerance towards GTN (Figure 6D), the present results demonstrate the induction of cross-tolerance towards TEAN by *in vivo* treatment with GTN (Table 2 and Figure 7D).

#### Mitochondrial ROS formation upon *in vivo* treatment with organic nitrates

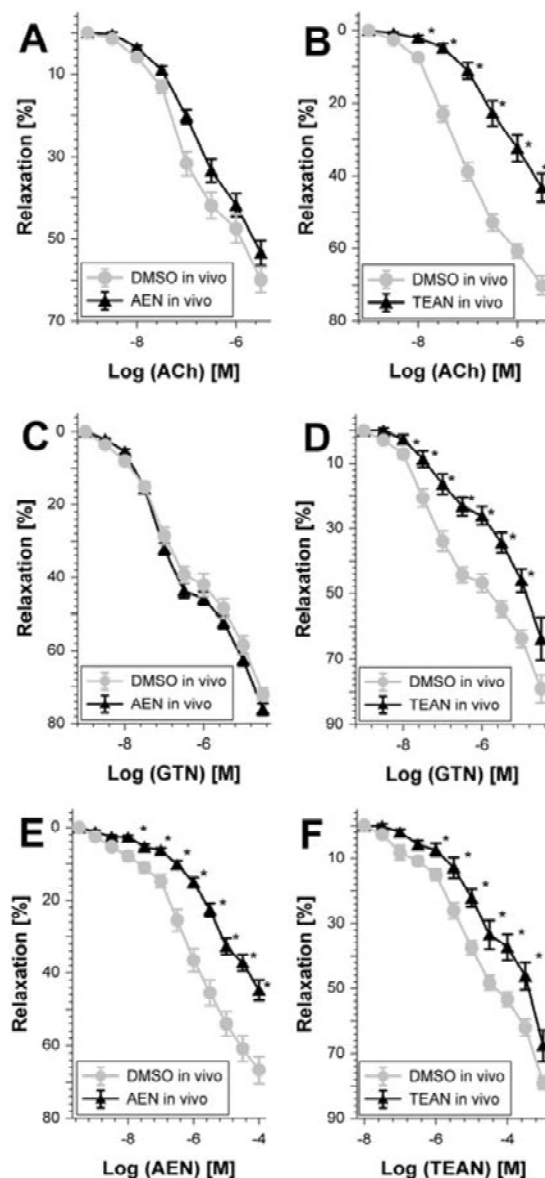
In isolated heart mitochondria from wild-type mice, the L-012-derived chemiluminescence signal increased in response to *in vivo* therapy with either TEAN or GTN whereas *in vivo* treatment with AEN had no effect on mitochondrial ROS formation (Figure 8).

#### Discussion

The present study extends our previous results on organic nitrate bioactivation and tolerance mechanisms (Munzel et al., 2005a; Daiber et al., 2008). We have shown that a clear correlation between the number of nitrate (–ONO<sub>2</sub>) groups in the molecule and the vasodilator potency exists (Koenig et al., 2007a; Wenzel et al., 2007b). Moreover, we demonstrated that potency correlates with the induction of the formation of mitochondrial ROS (Daiber et al., 2004). This postulate was challenged by the new mononitrate 2-aminoethyl nitrate (AEN), which was shown to have a potency similar to that of GTN in a previous study (Koenig et al., 2007b).

An impressive potency for AEN (pD<sub>2</sub> = 6.09 ± 0.06) was also found using murine aortic vessel segments. This high potency was far above the pD<sub>2</sub>-values normally reported for mononitrates: 3.24 ± 0.03 for pentaerythrityl mononitrate (PEMN), 2.61 ± 0.19 for ISMN in murine aorta (Wenzel et al., 2007b) and 4.14 ± 0.02 for PEMN, 4.48 ± 0.03 for ISMN in porcine pulmonary arteries (Koenig et al., 2007a). Consistent with previous findings, the AEN potency was quite similar to that of GTN (pD<sub>2</sub> = 6.72 ± 0.13) in the present study.

Even more surprisingly, AEN did not induce either tolerance (tachyphylaxis) *in vitro* or mitochondrial ROS formation

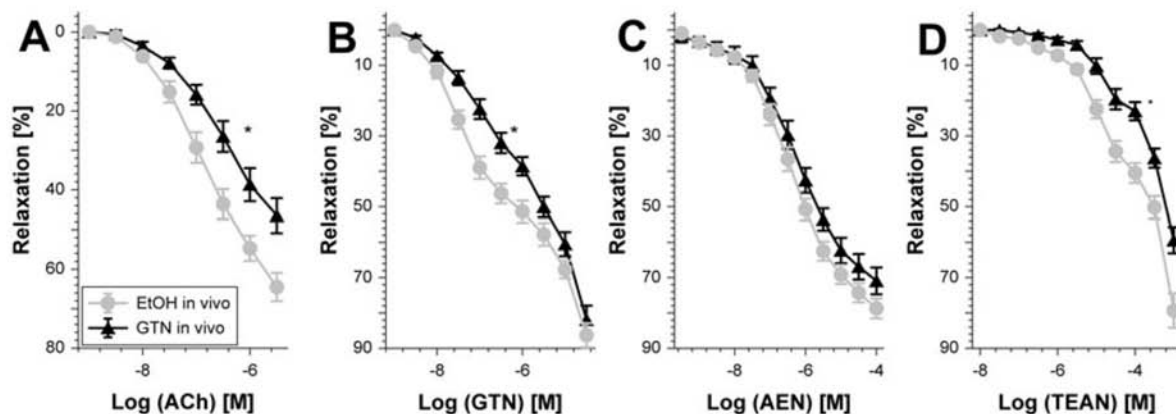


**Figure 6** Potency of different vasodilators after chronic 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (AEN) or triethanolamine trinitrate (TEAN) treatment. Relaxation was assessed by recording isometric tension in aortic segments from wild-type mice. The effect of AEN treatment *in vivo* ( $150 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$  per 3 days) on relaxation to acetylcholine (ACh) (A), glyceryl trinitrate (GTN) (C) and AEN (E) was tested. Similarly, the effect of TEAN ( $140 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$  per 3 days) on relaxation to ACh (B), glyceryl trinitrate (GTN) (D) or TEAN (F) was assessed. For both nitrates dimethyl sulphoxide (DMSO) was used as a solvent control. Data show mean  $\pm$  SEM of 12–19 (AEN) and 7–12 (TEAN) independent experiments with tissue from at least five animals per group. \* $P < 0.05$  versus DMSO solvent control.

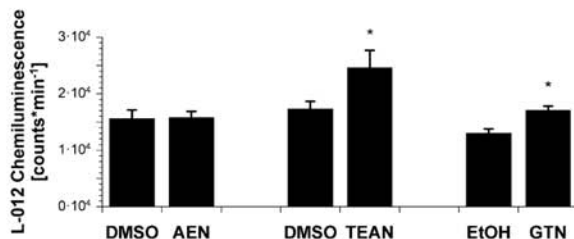
and is not dependent on ALDH-2 for its activity either. In contrast, the new less potent trinitrate TEAN ( $\text{pD}_2 = 4.82 \pm 0.12$ ) showed impaired vasorelaxant activity in ALDH-2 $^{-/-}$  mice, induced severe tolerance (tachyphylaxis) *in vitro* and evoked mitochondrial ROS formation. Another organic mononitrate (NPME,  $\text{pD}_2 = 4.47 \pm 0.17$ ) did not rely on ALDH-2 for its bioactivation and induced almost no mitochondrial ROS formation. NPME caused no tolerance (tachyphylaxis) *in vitro* either, although repeated challenge of the vessel with high concentrations caused a significant loss of potency in ALDH-2-deficient aorta. Whether this is related to the recently reported additive oxidative stress caused by ALDH-2 insufficiency and organic nitrate overload (Wenzel et al., 2008a) remains to be established. In addition, there was no significant difference between ROS formation in wild-type versus ALDH-2 $^{-/-}$  mitochondria. Finally, it should be noted that all organic nitrates tested caused an increase in mitochondrial nitrated proteins. This might be best explained by the release of NO and simultaneous superoxide formation by organic nitrates, resulting (at least in compartments where the nitrate accumulates or by over-dosing) in nitrosative/oxidative stress, which may also cause protein tyrosine nitration (e.g. by nitrite/hydrogen peroxide and peroxidases or peroxynitrite formation) (Halliwell, 1997). However, the degree of tyrosine nitration might reflect the balance between undesired oxidative stress and vasorelaxing potency, because the nitrate with the least favourable profile (TAEN) was the most potent at evoking tyrosine nitration.

We also studied the development of *in vivo* tolerance in response to chronic treatment with these organic nitrates. As expected from the *in vitro* data, AEN did not induce cross-tolerance to the endothelium-dependent vasodilator ACh (no endothelial dysfunction) or to GTN. Surprisingly, *in vivo* treatment with AEN showed significant development of tolerance to itself but failed to increase mitochondrial ROS formation. In contrast, *in vivo* treatment with the trinitrate TEAN caused cross-tolerance to ACh (endothelial dysfunction) and GTN as well as to itself. TEAN also significantly and most efficiently increased ROS formation and protein tyrosine nitration in isolated mitochondria. Therefore, the observation that TEAN caused the most pronounced tolerance effects *in vitro* and *in vivo* is compatible with its ability to induce severe oxidative stress, supporting the concept that oxidative stress is involved in the development of nitrate and cross-tolerance.

In a last set of experiments we tested the development of cross-tolerance to AEN and TEAN induced by chronic treatment with GTN *in vivo*. In accordance with previous data, chronic GTN infusion caused cross-tolerance to ACh (endothelial dysfunction) and tolerance to itself whereas AEN potency was not impaired in response to *in vivo* GTN treatment. The latter result was expected because *in vivo* AEN treatment also did not cause cross-tolerance to GTN. In contrast, TEAN potency was impaired in GTN-tolerant vessels indicating cross-tolerance to TEAN, which was in accordance with the observation that *in vivo* TEAN treatment resulted in cross-tolerance to GTN. Although TEAN was less potent than GTN, *in vivo* treatment with the latter resulted in a less pronounced increase in mitochondrial ROS formation and nitrated protein as compared with TEAN.



**Figure 7** Potency of different vasodilators after chronic glyceryl trinitrate (GTN) treatment. Relaxation was assessed by recording isometric tension in aortic segments from wild-type mice. The effect of GTN treatment *in vivo* ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$  per 3 days) on relaxation to acetylcholine (ACh) (A), GTN (B), 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (AEN) (C) and triethanolamine trinitrate (TEAN) (D) was assessed. Data are mean  $\pm$  SEM of 12–18 (ACh, GTN, TEAN) or 27–28 (AEN) independent experiments with tissue from at least seven animals per group. \* $P < 0.05$  versus ethanol (EtOH) solvent control.



**Figure 8** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) formation after chronic organic nitrate treatment. Isolated cardiac mitochondria ( $0.1 \text{ mg protein mL}^{-1}$ ) where stimulated with succinate ( $5 \text{ mM}$ ), the chemiluminescence signal was detected using a single photon counter in the presence of the dye L-012 ( $100 \mu\text{M}$ ). The organic nitrates 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (AEN), triethanolamine trinitrate (TEAN) and glyceryl trinitrate (GTN) were infused at a dose of  $150$ ,  $140$  or  $50 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$  for 3 days respectively. Data are mean  $\pm$  SEM of 24 (AEN), 20–21 (TEAN) and 13–17 (GTN) independent experiments with mitochondria from at least eight animals per group. \* $P < 0.05$  versus solvent (sham-treated) control.

An important finding of the present study is the observation that AEN potency is not linked to increased mitochondrial ROS formation in response to bolus challenges, which was previously observed for other nitrates (Daiber et al., 2004). Also, *in vitro* tolerance was absent with AEN, which was considered a feature of the low-potency nitrates so far (ISMN and PEMN). With respect to induction of *in vitro* tachyphylaxis and mitochondrial ROS formation, the trinitrate TEAN behaved in the same manner like a high potency organic nitrate without sharing its high potency. Even more important is the finding of an independent bioactivation pathway for AEN, which was not affected by chronic GTN treatment but obviously was affected by chronic AEN infusion. The lack of an effect of ALDH-2 deficiency and pharmacological inhibition of ALDH isozymes by benomyl on AEN potency together suggest that AEN uses a bioactivation pathway different from that used by GTN. Moreover, the

superior potency of AEN compared with other mononitrates leads us to speculate that AEN uses a different bioactivation pathway from those previously described for low-potency nitrates (e.g. P450 proteins) (Munzel et al., 2005a); otherwise this high potency of AEN would be hard to achieve.

Of note, important differences exist between *in vitro* and *in vivo* nitrate tolerance: the former is a consequence of the overload of nitrate bioactivating mechanisms that follows exposure to high concentrations of organic nitrates in a time frame that is too short to allow regeneration of these mechanisms. In contrast, *in vivo* tolerance is determined by the activation of counter-regulatory mechanisms at the humoral, genomic and proteomic level. The observation that AEN does not cause tachyphylaxis or cross-tolerance to GTN but, in contrast, induces severe tolerance to itself, along with the lack of increased mitochondrial oxidative stress, suggests that oxidative alterations play if at all a less important role in the effects of AEN. It is more likely that AEN causes alterations in the protein and gene expression profiles that lead to the observed *in vivo* tolerance. Another possibility is that AEN inactivates its bioactivating system by direct interaction (e.g. by covalent binding). While chronic treatment with ISDN, ISMN and GTN result in clinical tolerance (Schulz et al., 2002; Sekiya et al., 2005; Thomas et al., 2007), PETN is devoid of tolerance development and even more importantly, preserves endothelial function (Jurt et al., 2001; Gori et al., 2003).

Previous *in vitro* observations clearly indicate that there is a correlation between the potency, mitochondrial ROS formation and inhibition of mitochondrial ALDH elicited by clinically used organic nitrates and which decrease according to the following order (Daiber et al., 2004):  $\text{GTN} \gg \text{PETN} > \text{PETriN} > \text{ISDN} > \text{PEDN} = \text{ISMN} = \text{PEMN}$ . This sequence indicates that the protective pathways of PETN described above are not operative in response to acute challenges because they occur at the level of gene and protein expression, which requires treatment times of more than 6 h. Obviously, overcharge of isolated tissue with PETN causes very similar tolerance phenomena as observed for GTN and results in impaired



vasodilator potency regardless of whether isolated aortae were pre-incubated with PETN at EC<sub>100</sub> (1 µM) concentrations or far higher (300 µM) (Koenig et al., 2007a).

In conclusion, our results further establish that organic nitrates are a heterogeneous group of drugs, which differ significantly with respect to their vasodilator potency, induction of tolerance and mitochondrial (as well as vascular) oxidative stress. AEN may represent a new class of organic nitrates, which does not induce tachyphylaxis *in vitro* or cause oxidative stress, and showed an impressively high potency compared with all the mononitrates tested so far but also to di- and trinitrates. According to our data, AEN-mediated vasodilatation is based on the NO/cGMP signalling pathway (NS2028 and PTIO effects) and its bioactivation involves xanthine oxidoreductase (allopurinol effect) rather than P450 or ALDH enzymes (miconazol and benomyl incubations), but further mechanistic studies are required to reveal the bioactivation pathway as well as the precise mechanism of action of AEN. Despite these beneficial and pharmacologically relevant properties, AEN induced severe tolerance *in vivo* to itself. This may be of clinical interest because AEN is part of the structure of the potassium channel blocker nicorandil which consists of a fused organic nitrate moiety. Nicorandil is devoid of clinical tolerance (Sekiya et al., 2005). There is also not much known about the denitration pathway of nicorandil but earlier work has suggested that it is mainly metabolized in the kidney and the denitrated product 2-nicotinamidoethanol is the major metabolite excreted in urine (Frydman, 1992). Therefore, future strategies aimed at developing organic nitrate-based vasodilators and hybriide molecules may include the insertion of AEN-like structures. According to a recent publication in *Science* activation of ALDH-2 protects the heart from ischaemic damage and vice versa inhibition of ALDH-2 contributes to cardiotoxic events (Chen et al., 2008). This accords with our previous observations that show ALDH-2 deficiency increases cardiotoxicity of doxorubicin and cardiovascular damage by nitroglycerine (Wenzel et al., 2008a) and aggravates age-dependent vascular dysfunction (Wenzel et al., 2008b). In view of these data the ability of an organic nitrate to prevent oxidative inhibition or down-regulation of ALDH-2 might not only be a beneficial side effect, but might even be essential in order to confer cardiac and vascular protection.

## Acknowledgements

The expert technical assistance of Jörg Schreiner, Nicole Schramm and Merle Götz is gratefully appreciated. The financial support by the German Research Foundation (SFB 553 to A.D., T.M. and SCHU 1486/2-1 to E.S.), by MAIFOR and Förderfonds grants from the University Hospital Mainz (A.D.) and by the Robert-Müller-Foundation (T.M. and A.D.) is gratefully acknowledged. This study contains parts of the thesis work of Luise Sydow.

## Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

## References

- Abrams J (1996). Beneficial actions of nitrates in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* **77** (13): 31C–37C.
- Anderson IJ, Meredith IT, Ganz P, Selwyn AP, Yeung AC (1994). Nitric oxide and nitrovasodilators: similarities, differences and potential interactions. *J Am Coll Cardiol* **24** (2): 555–566.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* **74** (8): 3203–3207.
- Cai H, Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87** (10): 840–844.
- Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D (2008). Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* **321** (5895): 1493–1495.
- Chen Z, Zhang J, Stamler JS (2002). Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** (12): 8306–8311.
- Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T et al. (2005). An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** (34): 12159–12164.
- Daiber A, Bachschmid M, Kavakli C, Frein D, Wendt M, Ullrich V et al. (2003). A new pitfall in detecting biological end products of nitric oxide-nitration, nitrosylation and nitrite/nitrate artefacts during freezing. *Nitric Oxide* **9** (1): 44–52.
- Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Bachschmid M, Wenzel P, Sydow K et al. (2004). Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol* **66** (6): 1372–1382.
- Daiber A, Oelze M, Sulyok S, Coldewey M, Schulz E, Treiber N et al. (2005). Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase in mice (Mn-SOD<sup>+/-</sup>): a novel approach to assess the role of oxidative stress for the development of nitrate tolerance. *Mol Pharmacol* **68** (3): 579–588.
- Daiber A, Wenzel P, Oelze M, Munzel T (2008). New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clin Res Cardiol* **97** (1): 12–20.
- Espluggues JV, Rocha M, Nunez C, Bosca I, Ibiza S, Herance JR et al. (2006). Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin: an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants. *Circ Res* **99** (10): 1067–1075.
- Forstermann U, Munzel T (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* **113** (13): 1708–1714.
- Frydman A (1992). Pharmacokinetic profile of nicorandil in humans: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* **20** (Suppl. 3): S34–44.
- Gori T, Al-Hesayen A, Jolliffe C, Parker JD (2003). Comparison of the effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on endothelium-dependent vasorelaxation in male volunteers. *Am J Cardiol* **91** (11): 1392–1394.
- Gryglewski RJ, Zembowicz A, Salvemini D, Taylor GW, Vane JR (1992). Modulation of the pharmacological actions of nitrovasodilators by methylene blue and pyocyanin. *Br J Pharmacol* **106** (4): 838–845.
- Halliwell B (1997). What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett* **411** (2–3): 157–160.
- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104** (22): 2673–2678.
- Ishihara S, Saito F, Ohhata Y, Kanai M, Mizuno H, Fujisawa M et al. (2003). Synthesis and collateral dilator activity of nitroxyalkylamides having direct or latent sulfhydryl moieties. *Bioorg Med Chem Lett* **13** (9): 1527–1530.
- Jakschik B, Needleman P (1973). Sulfhydryl reactivity of organic



- nitrates: biochemical basis for inhibition of glyceraldehyde-P dehydrogenase and monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 53 (2): 539–544.
- Jurt U, Gori T, Ravandi A, Babaei S, Zeman P, Parker JD (2001). Differential effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on the development of tolerance and evidence of lipid peroxidation: a human in vivo study. *J Am Coll Cardiol* 38 (3): 854–859.
- Kitagawa K, Kawamoto T, Kunugita N, Tsukiyama T, Okamoto K, Yoshida A *et al.* (2000). Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. *FEBS Lett* 476 (3): 306–311.
- Koenig A, Lange K, Konter J, Daiber A, Stalleicken D, Glusa E *et al.* (2007a). Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythrityl tetranitrate. *J Cardiovasc Pharmacol* 50 (1): 68–74.
- Koenig A, Roegler C, Lange K, Daiber A, Glusa E, Lehmann J (2007b). NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator. *Bioorg Med Chem Lett* 17 (21): 5881–5885.
- McCallum KS, Emmons WD (1956). Notes – the dissociation constants and infrared spectra of some nitroacids. *J Org Chem* 21 (3): 367–368.
- Mollnau H, Wenzel P, Oelze M, Treiber N, Pautz A, Schulz E *et al.* (2006). Mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance—comparison of nitroglycerin and pentaerythrityl tetranitrate in Mn-SOD<sup>+/–</sup> mice. *BMC Cardiovasc Disord* 6: 44.
- Munzel T, Daiber A, Mulsch A (2005a). Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res* 97 (7): 618–628.
- Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A (2005b). Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1551–1557.
- Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG (1995). Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 95 (1): 187–194.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 (6122): 524–526.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92 (3): 639–646.
- Raha S, McEachern GE, Myint AT, Robinson BH (2000). Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 29 (2): 170–180.
- Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM (2000). Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101 (16): 1899–1906.
- Schulz E, Tsilimangas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M *et al.* (2002). Functional and biochemical analysis of endothelial (dys-)function and NO/cGMP signalling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation* 105 (10): 1170–1175.
- Sekiya M, Sato M, Funada J, Ohtani T, Akutsu H, Watanabe K (2005). Effects of the long-term administration of nicorandil on vascular endothelial function and the progression of arteriosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 46 (1): 63–67.
- Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M *et al.* (2004). Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 113 (3): 482–489.
- Thomas GR, DiFabio JM, Gori T, Parker JD (2007). Once daily therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction in humans: evidence of a free-radical-mediated mechanism. *J Am Coll Cardiol* 49 (12): 1289–1295.
- Wennmalm A (1994). Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J Intern Med* 235 (4): 317–327.
- Wenzel P, Hink U, Oelze M, Schuppan S, Schaeuble K, Schildknecht S *et al.* (2007a). Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity: IMPLICATIONS FOR MITOCHONDRIAL OXIDATIVE STRESS AND NITRATE TOLERANCE. *J Biol Chem* 282 (1): 792–799.
- Wenzel P, Hink U, Oelze M, Seeling A, Isse T, Bruns K *et al.* (2007b). Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: a proof of concept study in ALDH-2<sup>–/–</sup> mice. *Brit J Pharmacol* 150: 526–533.
- Wenzel P, Muller J, Zurmeyer S, Schuhmacher S, Schulz E, Oelze M *et al.* (2008a). ALDH-2 deficiency increases cardiovascular oxidative stress—evidence for indirect antioxidative properties. *Biochem Biophys Res Commun* 367 (1): 137–143.
- Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhofer J, Muller J, Hortmann M, Oelze M *et al.* (2008b). Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc Res* 80 (2): 280–289.



## **Publikation 5**

### **Medizinische Chemie der organischen Nitrate und PDE5-Hemmer.**

Roegler, Carolin; Lehmann, Jochen.

*Pharmazie in unserer Zeit* **2010**, angenommen, erscheint Oktober 2010.

Gegenstand von Veröffentlichung 5 waren organische Nitrate und PDE5-Hemmer. Für diesen Übersichtsartikel (invited review) wurden historische und aktuelle Aspekte sowie zukünftige Perspektiven hinsichtlich der Medizinischen Chemie beider Substanzklassen recherchiert und zusammengefasst.

**Eigenanteil:** Recherche und Verfassen des Übersichtsartikels.



# Wie zwei Zufallsentdeckungen den Markt eroberten

## Medizinische Chemie der Nitrate und PDE5-Hemmer

CAROLIN ROEGLER | JOCHEN LEHMANN

Sowohl organische Nitrate als auch Hemmstoffe der Phosphodiesterase 5 (PDE5) sind vasodilatatorische Substanzen. Während die zunächst als Sprengstoffe konzipierten organischen Nitrate als Antianginosa hauptsächlich zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit (KHK) genutzt werden, finden die ursprünglich zur Angina-pectoris-Therapie entwickelten PDE5-Hemmer Anwendung als Therapeutika der erektilen Dysfunktion sowie der pulmonalen Hypertonie.

### Organische Nitrate Entdeckung der organischen Nitrate

Am Anfang stand eine Ungeschicklichkeit: 1846 wischte der Chemiker Christian Friedrich Schönbein verschüttete Nitriersäure – ein Gemisch aus konzentrierter Salpeter- und Schwefelsäure – mit einem Baumwollappen auf, hängte ihn zum Trocknen an den Ofen und musste erleben, dass das äußerlich unveränderte Gewebe in einem Feuerschein explodierte. Entscheidend für die weitere Entwicklung war, dass Schönbein diesen Vorgang richtig als Nitrierung der Hydroxylgruppen der Cellulose interpretierte und publizierte (*Itzeboer Wochenblatt* vom 29. Oktober 1846, 1626 f.) (Abb. 1).

Das wegen seines explosiven Potentials als „Schießbaumwolle“ bezeichnete Cellulosepolynitrat erregte Aufsehen und wurde in der Folge nicht nur als Explosivmunition eingesetzt. 1856 entwickelte man daraus Zelluloid, aus dem z.B. seit 1890 bis heute Tischtennisbälle gefertigt werden, 1884 machte Jules Verne eine durch Schießbaumwolle angetriebene Mondrakete zum Mittelpunkt seines Romans „Von der Erde zum Mond“ und ab 1884 stellte man eine neuartige Textilie, Chardonnetseide, daraus her.

Als der italienische Arzt und Chemiker Ascanio Sobrero verschiedene Alkohole mit einem Gemisch aus Schwefel- und Salpetersäure behandelte, hatte er – angeregt durch die Beobachtung von Schönbein – vor, noch brisantere Sprengstoffe zu entwickeln. Bereits 1846 erhielt er bei diesen Versuchen Glyceroltrinitrat (GTN), den Salpetersäure-

TAB. 1 ORGANISCHE NITRATE

Substanz	Darreichung	Dosis	Halbwertszeit
GTN	Spray	0,4 mg	2 min
	Zerbeißkapseln	0,8 mg	
	Pflaster	5–10 mg	
ISDN	Tablette	5–40 mg	30–40 min
	Tablette, retardiert	20–120 mg	
	Spray	1,25 mg	
ISMN	Tablette	20–40 mg	4–5 h
	Tablette, retardiert	40–100 mg	
PETN	Tablette	50–80 mg	ca. 7 h

Übliche Darreichungen und Dosierungen der offiziell verwendeten organischen Nitrate (aus: Rote Liste 2009)

ester des Glycerols – häufig, aber chemisch nicht korrekt, auch Nitroglycerin genannt.

Bei einem ersten pharmakologischen Test, der damals üblichen organoleptischen Prüfung von neuen Substanzen im Eigenversuch, brachte er einen Tropfen der öligen Substanz (ca. 50 mg!) auf die Zunge – aus heutiger Sicht (Tab. 1) eine dramatische Überdosierung –, wonach er ein „zerreisßendes Pochen an den Schläfen und starke Schmerzen“ im geröteten Kopf registrierte. Sowohl Haupt- (Vasodilatation) als auch Nebenwirkung (Kopfschmerz) der organischen Nitrate wurden hier schon deutlich. Zwei Jahre später befasste sich zunächst der Homöopath Constantin Hering mit der neuen Substanz, als er nämlich mit dem Kopfschmerz

ABB. 1 ENTDECKUNG DER SCHIEßBAUMWOLLE

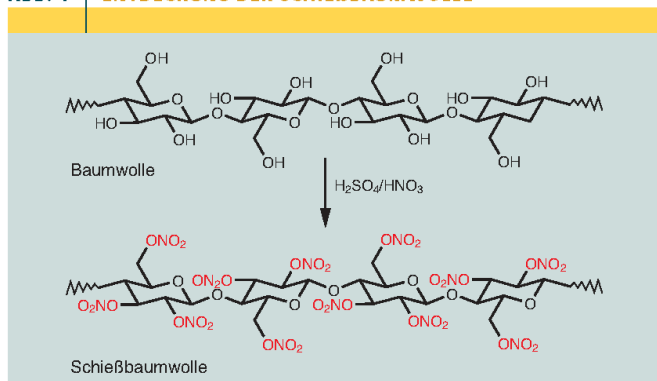
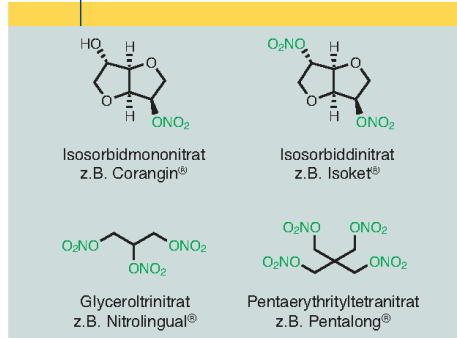


ABB. 2 ORGANISCHE NITRATE



## Strukturen der klinisch relevanten organischen Nitrate.

erzeugenden GTN, ganz im Sinne der aufgekommenen Homöopathie, Kopfschmerzen behandelte. Der Arzt William Murrell setzte schließlich ab 1879, zunächst in einer Studie mit 35 Angina-pectoris-Patienten, GTN unter dieser Indikation klinisch ein [1]. 1890 hatte Alfred Nobel, der aus GTN das Dynamit entwickelte, Anlass zu der Bemerkung: „*It sounds like the irony of fate that I should be ordered by my doctor to take nitroglycerin internally*“.

Nach und nach kamen weitere Nitrate auf den Markt, die sich von GTN hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik, nicht jedoch ihrer Pharmakodynamik, unterscheiden. In Deutschland konnten sich mit Isosorbidmononitrat (ISMN), Isosorbiddinitrat (ISDN), Glyceroltrinitrat (GTN) und Pentaerythritoltetranitrat (PETN) vier organische Nitrate durchsetzen (Abb. 2), wobei dem PETN in verschiedener Hinsicht eine Sonderstellung zukommt.

PETN war lange nur in den USA, Skandinavien, Frankreich und der ehemaligen DDR auf dem Markt vertreten, von wo aus es sich, nach der Wiedervereinigung und einer dann folgenden vorübergehenden Abkehr von diesem „Ostpräparat“, recht erfolgreich entwickelte und in jüngerer Zeit auch in Richtung der alten Bundesländer ausbreitete. Tatsächlich sind, bei insgesamt eher rückläufigem „Nitratmarkt“ in den letzten Jahren, die Verordnungen von PETN in Deutschland stetig angestiegen [2]. Dazu beigetragen haben sicher klinisch-pharmakologische Besonderheiten des PETN (siehe unten), die auch eine vergleichsweise intensive wissenschaftliche Fokussierung auf diese Substanz nach sich zogen.

Auffällig bei PETN ist, dass es sich im Experiment an isolierten Blutgefäßen als sehr potent, hier sogar dem GTN überlegen erweist [3], klinisch aber, vermutlich wegen geringer Bioverfügbarkeit, in relativ hohen Dosen verabreicht wird (Tab. 1). Vorteilhaft sind ferner die geringe Toleranzentwicklung und der weitgehend ausbleibende Nitratkopfschmerz.

## Entdeckung von NO als EDRF

Obwohl GTN seit seiner Entdeckung 1846 und seiner Etablierung als Therapeutikum vor mittlerweile über einem Jahrhundert eines der am häufigsten verwendeten antianginösen Arzneimittel ist, blieb sein molekularer Wirkungsmechanismus lange Zeit unbekannt.

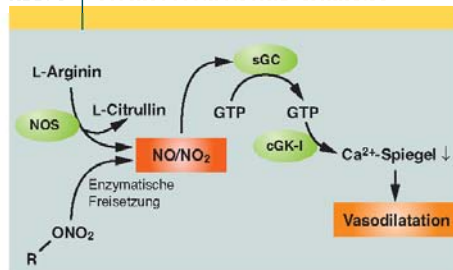
Den Grundstein zur Aufklärung legte Ferid Murad 1977, der sich für das Enzym Guanylatcyclase interessierte, welches er in seinem Labor zur Verfügung hatte und relativ wahllos diverse Substanzen zum Enzym gab, um für dieses Inhibitoren oder Stimulatoren zu finden. Dabei konnte er zeigen, dass gasförmiges Stickstoffmonoxid (NO) wie auch organische Nitrate die glatte Gefäßmuskulatur durch Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) und darauf folgender Erhöhung von cGMP erweitern (vgl. Abb. 7).

Robert Furchgott wiederum fand 1980 heraus, dass nur bei vorhandenem und unbeschädigtem Gefäßendothel eine Reaktion auf vasoaktive Substanzen hervorgerufen wird. Er schloss daraus, dass die Erweiterung von Blutgefäßen durch Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur ihren Ausgangspunkt im Endothel hat, wo bei Bedarf ein auslösender Faktor synthetisiert wird, der in die anliegende glatte Muskulatur diffundiert und dort die Gefäßdilatation verursacht. In Unkenntnis dieses endogenen, chemisch labilen Vasodilators nannte Furchgott diese Substanz „*Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF)“. Sieben Jahre später gelang schließlich Louis Ignarro die Identifizierung von EDRF als Stickstoffmonoxid (NO) durch systematischen Vergleich von natürlichem, aus Endothelzellen isoliertem EDRF und Stickstoffmonoxid aus der Stahlflasche [1].

## Wirkmechanismus der organischen Nitrate

Der Mechanismus der nitratinduzierten Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur beruht auf einem mehrstufigen Prozess (Abb. 3). Sicher ist, dass es nach Gabe eines organischen Nitrates zu einer Stimulation der sGC kommt. Infolgedessen steigt der intrazelluläre Spiegel von cyclischem Guanosin-3,5-monophosphat (cGMP) aus Guanosin-5-triphosphat (GTP). Hierdurch werden anschließend cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK-I) aktiviert, was wiederum

ABB. 3 STICKSTOFFMONOXID-WIRKUNG



## Wirkmechanismus von endogenem und exogenem Stickstoffmonoxid.

zu einem Abfall der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und damit zur Vasodilatation führt. Den gleichen Signalweg nutzt auch endogen gebildetes Stickstoffmonoxid, welches mittels NO-Synthasen aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird [4].

Diskutiert wird allerdings immer noch die Frage, ob aus den Nitraten gebildetes NO, NO-ähnliche Spezies oder die Nitrate selbst die bioaktiven Verbindungen sind. Es wäre logisch und es gibt Hinweise darauf, dass es sich um NO handelt, allerdings ist es bisher nicht gelungen, aus therapeutisch relevanten Konzentrationen von GTN eine NO-Freisetzung nachzuweisen. Nur aus Dosen, die weit über den praktisch eingesetzten liegen, ließ sich NO identifizieren.

Andererseits war es in Gegenwart isolierter ALDH2 (mitochondrialer Aldehyddehydrogenase) möglich, eine direkte NO-Bildung aus GTN zu detektieren. Außerdem konnte auch durch NO-bindende Substanzen wie z.B. Hämoglobin oder Superoxid die GTN-induzierte Gefäßrelaxation beeinflusst werden, was wiederum doch für NO als aktives Wirkprinzip spricht [5].

Über einen sehr ähnlichen Mechanismus wie in der glatten Gefäßmuskulatur wirkt NO auch bei der Inhibition der Thrombozytenaggregation. Als *second messenger* fungiert hier ebenfalls, nach Aktivierung der sGC, erhöhtes cGMP. Dies führt zu einer Absenkung des Calciumspiegels und darauf folgend zu einer Reduktion der Fibrinogenbindung zum Glycoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor [6].

Typische unerwünschte Nebenwirkungen unter Nitrattherapie sind der so genannte „Nitratkopfschmerz“ sowie Gesichtsrötungen („*Flush*“), die sich beide durch lokale Gefäßerweiterung im Kopf- und Halsbereich erklären lassen. Außerdem kann es bei hoch dosierter Nitratgabe zu orthostatischen Nebenwirkungen wie Schwindel und Hypotonie kommen.

#### Medizinische Chemie der organischen Nitrate

Bei den organischen Nitraten handelt es sich um die Ester der Salpetersäure. Sie sind die am häufigsten gebrauchten NO-abgebenden Arzneistoffe. Das am besten erforschte, bei wissenschaftlichen Untersuchungen auch bevorzugt einge-

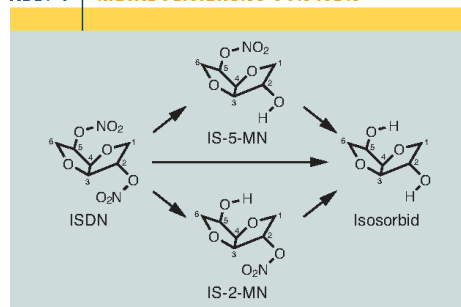
setzte organische Nitrat ist GTN. Seine vorrangige Anwendung liegt aufgrund der schnellen Resorption und raschen Wirkung in der Kupierung des akuten Angina-pectoris-Anfalls (Tab. 1). Hierbei wird es als Spray oder in Form von Zerkleibungskapseln appliziert. Ebenfalls hat sich die Anwendung als transdermales therapeutisches System oder als Salbe etabliert, da GTN gut über die Haut resorbiert werden kann. Da mittlerweile auf dem Markt auch organische Nitrate mit einer längeren Halbwertszeit verfügbar sind, ist eine orale Therapie mit GTN in retardierter Form nicht mehr als sinnvoll anzusehen.

GTN wird im Körper durch die Glutathion-S-Transferase in der Leber metabolisiert. Hierbei entstehen zunächst anorganisches Nitrit sowie die Metaboliten 1,2-Glyceroldinitrat (1,2-GDN) und 1,3-Glyceroldinitrat (1,3-GDN), die im Folgenden zu 1- bzw. 2-Glycerolmononitrat weiter abgebaut werden. In vaskulärem Gewebe kommt es zu einer regio-selektiven Verstoffwechselung, die ausschließlich zum 1,2-GDN führt [5]. Diese Endprodukte werden entweder an Glucuronsäure gekoppelt oder unverändert renal eliminiert.

Isosorbiddinitrat (ISDN) zeigt im Vergleich zu GTN eine höhere orale Bioverfügbarkeit sowie eine verlängerte Halbwertszeit. Daher kann es sowohl im akuten Anfall als auch zur Anfallsprophylaxe angewendet werden. In der Leber wird ISDN zu den strukturisomeren aktiven Metaboliten Isosorbid-2-mononitrat (IS-2-MN) und Isosorbid-5-mononitrat (IS-5-MN, ISMN) hydrolysiert. Von beiden Produkten dominiert IS-5-MN, was auf die räumliche Struktur des ISDN zurückzuführen ist [7]. Aufgrund der exponierten *ex*-Ständigkeit des Nitratrestes an Position 2 kann dieser leichter biotransformiert werden (Abb. 4). Dies erklärt auch die unterschiedlichen Halbwertszeiten beider Stoffwechselprodukte. Der weniger reaktive Metabolit IS-5-MN, der sich daraufhin auch als eigenständiges Präparat durchsetzt, unterliegt keinem *First-Pass*-Effekt und zeichnet sich folglich durch eine hohe Bioverfügbarkeit aus. Allerdings wird er eher langsam resorbiert und kann damit zwar für die Anfallsprophylaxe eingesetzt werden, eignet sich dagegen nicht mehr zu einer Behandlung akuter Anfälle [8].

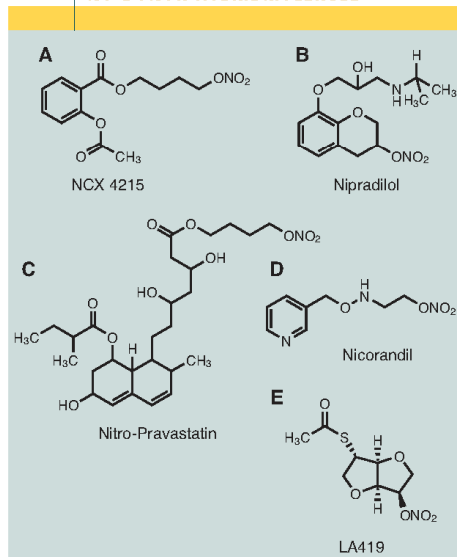
Pentaerythrityltetranitrat (PETN) ist aus dieser Gruppe mit einer Halbwertszeit von ungefähr sieben Stunden das am längsten wirksame Nitrat (Langzeitnitrat). Als Einziges unter den organischen Nitraten zeigt es klinisch oder *in vivo* im Tierexperiment nicht die unter Nitrattherapie normalerweise auftretende Nitratoleranz, also keine abgeschwächte Antwort der Gefäße auf eine wiederholte Nitratgabe. Die Frage, warum das so ist, wird noch diskutiert. Es gibt deutliche Hinweise, dass nicht das schlecht lösliche und schlecht resorbierbare PETN selbst der aktive Wirkstoff ist, sondern die sukzessiv in begrenzter Menge entstehenden, schwächer wirksamen, aber besser resorbierbaren Metabolite Pentaerythrityldinitrat (PEDiN) und Pentaerythritylmononitrat (PEMN) für das typische klinische Wirkprofil von PETN verantwortlich sind. Dies würde nicht nur das langsame Anfluten und die langanhaltende Wirkung von PETN, sondern auch die erforderliche hohe Dosierung er-

ABB. 4 | METABOLISIERUNG VON ISDN



(nach [7])

**ABB. 5** STRUKTUREN VERSCHIEDENER NO-DONOR-HYBRIDMOLEKÜLE



klären. Da schließlich PEDiN und PEMN nicht zu Toleranzentwicklung neigen, wäre auch die Toleranzfreiheit des PETN verständlich [3]. Eine andere Theorie stützt sich auf die Induktion der Hämooxygenase-1 (HO-1) durch PETN. Die HO-1 ist ein antioxidativ wirkendes Enzym, das wiederum das Antioxidans Bilirubin sowie die Expression eines weiteren antioxidativ wirkenden Enzyms, Ferritin, stimuliert. Durch den auf diese Weise reduzierten oxidativen Stress kann es ebenfalls zu einer Verminderung der Toleranzentwicklung kommen [4].

In den letzten Jahren hat zudem die Forschung auf dem Gebiet der Nitrat-Hybride stark zugenommen. Darunter versteht man Verbindungen, bei denen bewährte Arzneistoffstrukturen mit einer Nitratfunktion molekular vereinigt werden. Die Umsetzung dieser Strategie begann mit der Entwicklung von Nitrat-NSAID-Hybriden, wie z.B. Nitrat-Aspirin-Derivaten (Abb. 5A). Angestrebt wird hier ein Synergismus der analgetischen, antiphlogistischen Wirkung der NSAIDs und dem gastroprotektiven Effekt von NO durch Erhöhung der Mucosadurchblutung und Magenschleimsekretion. So sollte den gastritischen Nebenwirkungen der nicht-steroidalen Antiphlogistika entgegengewirkt werden. Erste Ergebnisse sind vielversprechend und ein breiter Einsatz solcher Hybridverbindungen auf dem Gebiet kardiovaskulärer Erkrankungen, aber auch in der Krebstherapie oder der Alzheimerschen Krankheit scheint möglich, lässt aber immer noch auf sich warten.

Des Weiteren gibt es neue Ansätze in der Hybridforschung durch Kopplung von organischen Nitraten z.B. mit Statinen oder  $\beta$ -Blockern (Abb. 5B und 5C). In Kombinati-

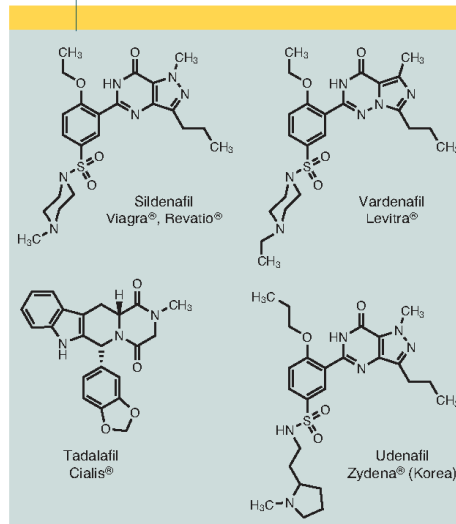
on mit einem Statin soll dessen Wirkung ergänzt werden, man erhofft sich unter anderem eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion.

Eine Nitrat-Hybrid-Verbindung, die es zumindest in einigen Ländern auf den Markt geschafft hat, ist das Nicotinamidderivat Nicorandil (Abb. 5D). Es handelt sich hierbei um eine Substanz, die sowohl als Kaliumkanalöffner als auch als organisches Nitrat wirkt. Es werden also zwei unterschiedliche blutdrucksenkende Wirkmechanismen effektiv. In der IONA-Studie (*impact of nicorandil in angina*) wurde mittels Nicorandil außerdem eine signifikante Erniedrigung koronarer Ereignisse nachgewiesen [9].

Obwohl schon seit einiger Zeit keine neuen Organonitrate mehr auf den Markt gekommen sind, wird weiterhin auf diesem Gebiet geforscht. Obwohl mit PETN dieses Problem nicht mehr als so drängend erscheint, erschien in jüngerer Zeit die Suche nach „toleranzarmen“ Nitraten noch attraktiv. Außerdem kann es bei einer Behandlung mit Nitraten wie z.B. GTN zu einer endothelialen Dysfunktion sowie zu oxidativem Stress kommen, was negative Auswirkungen auf die Prognose der Patienten hat. Ob das Phänomen der Toleranz in Zusammenhang mit der endothelialen Dysfunktion und oxidativem Stress steht, wird in der Literatur intensiv diskutiert.

Mit dem vom ISMN abgeleiteten Thioamid LA419, im Grunde einem Thiol-Nitrat-Hybrid, wurde eine Substanz entwickelt, die eine verringerte Toleranzbildung aufweisen soll (Abb. 5E). Das Design dieser und weiterer ähnlicher Verbindungen beruhte auf der früheren „Needleman-Hypothese“, dass die Ursache der Nitrattoleranz in einem unter der Behandlung wachsenden Thiolmangel zu sehen ist. Man

**ABB. 6** STRUKTUREN DER KLINISCH RELEVANTEN PDE5-HEMMER





fand, dass LA419 in Dosierungen, die keinen Einfluss auf den Blutdruck haben, antiischämisch, antithrombotisch und antiatherosklerotisch wirkt und außerdem die kardiale Hypertrophie reduziert [10]. Es bleibt abzuwarten, ob sich diese Eigenschaften auch in klinischen Studien beweisen lassen.

#### PDE5-Hemmer Entdeckung der PDE5-Hemmer

Auch die Hemmstoffe der Phosphodiesterase beruhen auf einer Zufallsentdeckung. Da bekannt war, dass es durch eine Hemmung der Phosphodiesterase zu einer Hemmung des cGMP-Abbaus und somit einer Anreicherung dieses *second messengers* kommt, versuchte man auf diese Weise, neue antianginöse Wirkstoffe zu entwickeln. Sildenafil, die erste synthetisierte Substanz zur PDE-Inhibition, stellte allerdings in der Behandlung der Angina pectoris im Vergleich zu den bisherigen, zu diesem Zeitpunkt schon lange etablierten organischen Nitraten keine Verbesserung dar. Bei den männlichen Probanden kam es jedoch zu einer Nebenwirkung, die später zur Hauptwirkung wurde, und zwar zur Stimulation der Peniserektion.

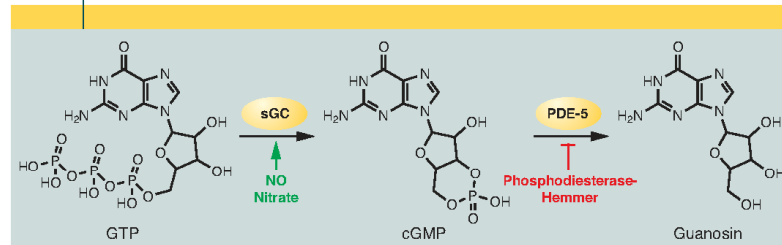
Sildenafil kam 1998 als Viagra® auf den Markt, wenig später folgten die anderen beiden in Deutschland zugelassenen Arzneistoffe Vardenafil® und Tadalafil®, die ebenfalls PDE5-Hemmer darstellen. In Korea wurde außerdem vor kurzem Udenafil ebenfalls zur Behandlung der erektilen Dysfunktion zugelassen (Abb. 6) [11].

Dass Hemmstoffe der PDE5 nicht nur als so genannte Lifestyle-Medikamente von Nutzen sind, zeigte sich 2006 durch die Zulassung von Sildenafil als Medikament gegen pulmonale Hypertonie (Revatio®). Seit einigen Jahren wird auch die Anwendung bei Höhenkrankheit diskutiert, die unter anderem mit einer lebensbedrohlichen höheninduzierten pulmonalen Hypertonie einhergeht. Eine Zulassung für diese Indikation gab es bisher jedoch nicht.

#### Wirkmechanismus der PDE5-Hemmer

Bei sexueller Stimulation kommt es zu einer NO-Freisetzung im Schwellkörper (Corpus cavernosum) des männlichen

ABB. 7 | WIRKMECHANISMUS DER PDE5-HEMMER



Gliedes. Über die bereits erwähnte (siehe Abb. 2) Signalkaskade führt diese zur Erweiterung der glatten Gefäßmuskulatur. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Durchblutung des Penis und somit schließlich zur Erektion. Zum Abbau des Botenstoffes cGMP dient im Corpus cavernosum die Typ-5-Isoform der Phosphodiesterase [12]. Hemmt man nun die Umsetzung von cGMP zu Guanosin, kommt es zu einer cGMP-Akkumulation und infolgedessen zur gesteigerten Vasodilatation (Abb. 7).

Auch im Lungengewebe wird verstärkt PDE5 exprimiert. Darauf beruht die Einsatzmöglichkeit von Sildenafil zur Therapie der pulmonalen Hypertonie.

Durch Hemmung anderer Subtypen der Phosphodiesterase kommt es zu den typischen unerwünschten Arzneimittelwirkungen der PDE5-Inhibitoren. Eine Hemmung der Isoform 6, die hauptsächlich in der Retina vorkommt, führt beispielsweise zu Sehstörungen. Hier hat aufgrund der Selektivität Tadalafil das günstigste Wirkungsspektrum (Tab. 2). Allerdings kann es unter Tadalafil-Gabe vermehrt zu Rückenschmerzen kommen, da es stärker die PDE11 beeinflusst, die im Skelettmuskel vorherrscht. Außerdem besteht wie bei den organischen Nitraten durch lokale Vasodilatation die Gefahr von Kopfschmerzen und „Flush“. Die Einnahme von PDE5-Hemmern unter Nitrattherapie ist kontraindiziert, da die Kombination zu einem lebensbedrohlichen Blutdruckabfall führen kann.

#### Medizinische Chemie der PDE5-Hemmer

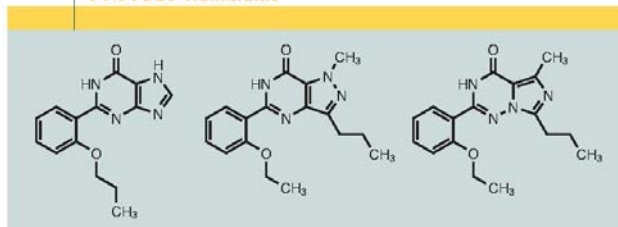
Betrachtet man die Strukturen der beiden PDE5-Inhibitoren Sildenafil und Vardenafil, erkennt man eine deutliche

TAB. 2 | ÜBERSICHT PDE5-HEMMER

	PDE5-Isoform				
	PDE5 (Penis, Lunge)	PDE1 (Koronar-Arterien)	PDE3 (Myokard)	PDE6 (Retina)	PDE11 (ubiquitär, u.a. Hoden, Skelettmuskulatur)
Sildenafil	0,0035 1	0,281 80	16,2 4630	0,037 11	2,73 780
Tadalafil	0,0067 1	>30 >4450	>100 >14800	1,26 187	0,037 5
Vardenafil	0,00014 1	0,07 500	>1,0 >7140	0,0035 24	0,162 1160

Affinitäten (IC<sub>50</sub>-Werte in µM) und Selektivität bezogen auf PDE5 (fett) der klinisch relevanten PDE-5 Hemmer (modifiziert nach [14]).

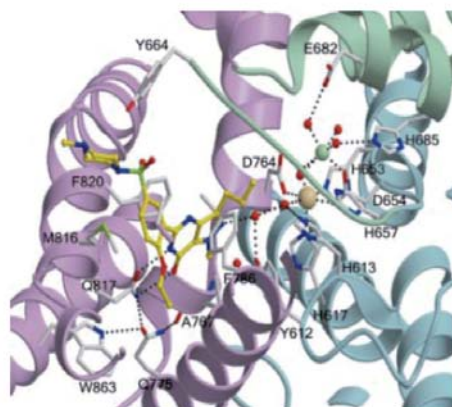
**ABB. 8** ERSTE LEITSTRUKTUREN ZUR ENTWICKLUNG VON PDE5-HEMMERN



strukturelle Ähnlichkeit zu cGMP. Als erste Leitstrukturen zur Hemmung der PDEs dienten phenylsubstituierte Purine (Abb. 8). Isostere Variationen des Puringerüsts zu Pyrazolopyrimidin (Sildenafil) und Imidazotriazinon (Vardenafil) konnten den inhibitorischen Effekt noch verbessern. Der Ersatz des Phenylrestes durch ein Piperazinsulfonamid optimierte den Effekt hinsichtlich der Selektivität zur Isoform 5 [12].

Das katalytische Zentrum des Enzyms besteht aus vier unterschiedlichen Regionen – der metallbindenden Region, der Kerntasche, der so genannten „Deckelregion“ und der hydrophoben Tasche. An der metallbindenden Seite befindet sich ein für die hydrolytische Spaltung von cGMP essentielles Zinkatom, welches durch zwei Histidine, zwei Aspartate und zwei Wassermoleküle koordiniert wird. Die Kerntasche beherbergt im Fall der Inhibition den Heterozyklus des Sildenafils, dessen Amidfunktion zwei Wasserstoffbrücken zum Amid von Glycin-817 ausbildet. Obwohl Sildenafil nicht direkt an das Zinkion bindet, wird über zwei Wassermoleküle eine indirekte Verbindung hergestellt (Abb. 9). Die für die PDE5 charakteristische Deckelregion nimmt den Methylpiperazinring des Sildenafils auf. Da sie spezifisch für den Subtyp 5 ist, liegt hier die Selektivität des Sildenafils begründet. Vardenafil, das sich strukturell nur minimal von Sildenafil unterscheidet, wird im katalytischen Zentrum über den gleichen Modus gebunden.

Der Bindungsmodus von Tadalafil, das sich auch strukturell stark von den beiden anderen PDE5-Inhibitoren abgrenzt, unterscheidet sich von dem der anderen. Zum Einen gibt es keine Interaktion mit der Deckelregion des Enzyms. Zum Anderen erfolgt die Bindung zum Glycin-817 nur über eine statt zwei Wasserstoffbrückenbindungen. In der hydrophoben Tasche, die beim Sildenafil die Ethoxygruppe auf-



**ABB. 9** Kristallstruktur von Sildenafil (gelb) innerhalb der Bindungstasche von PDE5 (aus [13]).

nimmt, gibt es starke Wechselwirkungen mit dem Methylen-dioxyphenylrestes des Tadalafilis. Auf diese Weise lässt sich dessen hohe Affinität erklären, obwohl Sildenafil und Vardenafil weitaus näher an die Struktur von cGMP angelehnt sind [13].

Sildenafil wird nach oraler Gabe gut und rasch resorbiert. Die Metabolisierung erfolgt in der Leber über Cytochrom P450, hauptsächlich vom Subtyp 3A4. Es kann also zu zahlreichen Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten kommen. Der Hauptmetabolit, N-Desmethyl-Sildenafil, besitzt eine ähnliche Selektivität wie Sildenafil und ungefähr 50 % seiner Aktivität.<sup>14</sup>

Wie schon die organischen Nitrate unterscheiden sich die PDE5-Hemmer nicht in ihrer Pharmakodynamik, sondern nur hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik, wobei die Unterschiede zwischen Sildenafil und Vardenafil nur marginal sind. Tadalafil hat im Vergleich dazu einen langsameren Wirkungseintritt, aber auch eine längere Wirkdauer. Dies kann in der häuslichen Anwendung von Vorteil sein (Tab. 3).

Ausgehend von Sildenafil gab es Versuche, bessere, d.h. also potentere und selektivere Inhibitoren zu synthetisieren. Erste Versuche gingen von Sildenafil als Grundstruktur aus (Abb. 10a), führten aber weder zu einer besseren Aktivität noch zu höherer Selektivität. Ein Pyrazolopyridinderivat (Abb. 10b) wirkte nach der *In-vitro*-Testung sehr vielversprechend. Mit einer hohen Affinität ( $IC_{50}$ -Wert = 0,8 nM) und einer 50-fachen Selektivität für PDE5 gegenüber PDE6 schien es dem Sildenafil überlegen zu sein. Allerdings wurden aufgrund der Blockade von HERG-Kaliumkanälen (speziellen Kaliumkanälen an den Herzmuskelzellen) und der Inhibition von CYP450-Enzymen die Tests eingestellt.

Kürzlich wurde ein weiterer PDE5-Inhibitor vorgestellt, der sich als hoch potent und sehr selektiv herausstellte (Abb. 10c). Im Tierversuch zeichnete er sich durch eine hohe Bioverfügbarkeit bei einer Halbwertszeit von ca. 2,5 h

**TAB. 3** PDE5-INHIBITOREN

Substanz	Indikation	Dosis	Halbwertszeit	Zeit bis $C_{max}$
Sildenafil	Erektile Dysfunktion Pulmonale Hypertonie	25–100 mg 20 mg	3–5 h	60 min
Vardenafil	Erektile Dysfunktion	5–20 mg	4–5 h	60 min
Tadalafil	Erektile Dysfunktion	5–20 mg	17,5 h	120 min

Übliche Indikationen und Pharmakokinetik der offiziellen PDE5-Inhibitoren (aus: Rote Liste 2009 und [14])

aus und wurde daraufhin für vorklinische Studien ausgewählt [15]. Mirodenafil (Abb. 10d), das strukturell große Ähnlichkeit mit den offizinellen PDE5-Hemmern hat, befindet sich derzeit in klinischen Studien zur Zulassung [16].

#### Die Zukunft der PDE5-Hemmer

Neben der Einsatzmöglichkeit als so genannte „Potenzmittel“ wurden in den letzten Jahren weitere, vielfältige Anwendungsmöglichkeiten diskutiert. Natürlich wurde auch für die beiden anderen offizinellen PDE5-Hemmer die Anwendung bei pulmonaler Hypertonie untersucht. Auch hier gab es gute Ergebnisse im Hinblick auf eine verbesserte Symptomatik.

Außerdem wird die mögliche Anwendung von PDE5-Inhibitoren bei Raynaud-Syndrom erörtert. Beim Raynaud-Syndrom handelt es sich um eine Gefäßerkrankung, die durch eine Vasokonstriktion der Endarterien den peripheren Blutfluss stark einschränkt. Sildenafilgabe erhöht den kapillaren Blutfluss und führt so zu einer Verminderung der Anzahl und Dauer der Attacken [16].

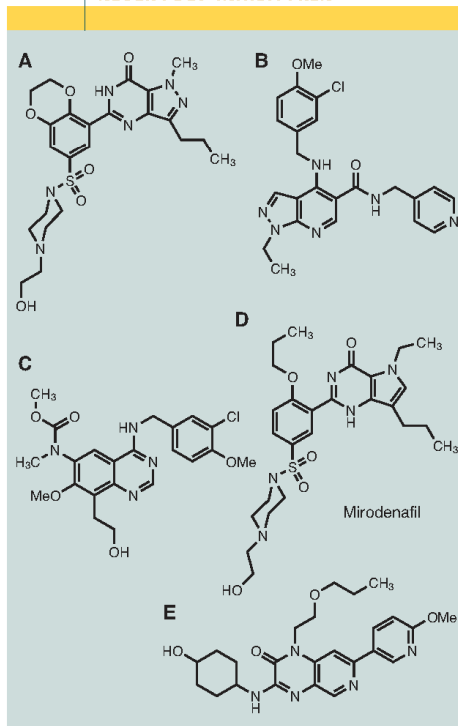
Gerade für Sildenafil gibt es mittlerweile ein breites Spektrum an möglichen Indikationen. Man fand heraus, dass es im Tiermodell zu antinotizipativen Effekten führt. Für den schmerzlindernden Effekt scheint eine periphere Anreicherung von cGMP verantwortlich zu sein. Gerade auf dem Gebiet des bisher schwer behandelbaren chronischen neuropathischen Schmerzes wird Sildenafil als potenzieller Kandidat gehandelt.

Auch bei der Neuroprotektion kommt es durch Sildenafil über den Glutamat-NO-cGMP-Signalweg zu signifikanten Effekten. Es zeigt eine Durchblutungsverbesserung des kortikalen Gewebes und führt dadurch sowohl zum Schutz vor Neurodegeneration als auch zur erhöhten Neurogenese. Diese Effekte können bei der Behandlung verschiedener Krankheiten von Nutzen sein. Zum Einen kann es durch die Neuroprotektion zu einer besseren Prognose für Multiple-Sklerose-Patienten beitragen. Sowohl Alter als auch Schlaganfälle haben negative Auswirkungen auf die Anzahl und das Wachstum von Neuronen. Auch hier kann eventuell die durch Sildenafil vermittelte Neurogenese zur Verbesserung der Symptome beitragen.

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist die Tatsache, dass Sildenafil zu einer verbesserten Leistung des Gedächtnisses führt. Der Gedächtnisverlust kann hierbei sowohl krankheits- als auch altersbedingt sein. Es gibt mehrere Theorien, wie es zu dieser erhöhten Gedächtnisleistung durch Sildenafil kommt. Eine vereinende Hypothese stützt sich auf die Auslösung einer komplexen Signalkaskade durch Anreicherung von cGMP: Präsynaptisch löst cGMP eine Ausschüttung von Glutamat und dadurch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren aus. Postsynaptisch kommt es zu einem Anstieg der Protein- sowie der Synaptogenese [17].

Diese neuen Ansätze würden alle von der Entwicklung eines zentral verfügbaren Wirkstoffes profitieren. Kürzlich wurde ein neuartiges, ZNS-gängiges Amidopyridopyrazinon-derivat (Abb. 10e) vorgestellt, das sich derzeit in klinischen Studien befindet [18].

ABB. 10 | ANSÄTZE ZUR ENTWICKLUNG NEUER PDE5-INHIBITOREN



Abschließend kann man sagen, dass PDE5-Inhibitoren neben der Behandlung der erektilen Dysfunktion und pulmonalen Hypertonie eine Vielzahl von potentiellen therapeutischen Wirkungen aufweisen. In Studien zeigte sich der Nutzen von PDE5-Hemmern bei der Neurogenese und Neuroprotektion, Verbesserung der Gedächtnisleistung sowie Antinotizeption. Diese Ansätze sind vielversprechend, bedürfen allerdings noch eingehenderer Untersuchungen.

#### Zitierte Literatur

- [1] Marsh, N., Marsh, A.: A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27 (2000), 313–319.
- [2] Schwabe, U., Paffrath, D.: Arzneimittelverordnungsreport. Springer, Berlin (2009), pp. 589–596.
- [3] Koenig, A., Lange, K., Konter, J., Daiber, A., Stalleicken, D., Glusa, E., Lehmann, J.: Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythrityl tetranitrate. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50 (2007), 68–74.
- [4] Daiber, A., Wenzel, P., Oelze, M., Munzel, T.: New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clin. Res. Cardiol.* 97 (2008), 12–20.

- [5] Mayer, B., Beretta, M.: The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. *Br. J. Pharmacol.* 155 (2008), 170–184.
- [6] Loscalzo, J.: Antiplatelet and antithrombotic effects of organic nitrates. *Am. J. Cardiol.* 70 (1992), 18B–22B.
- [7] Fung, H.L.: Do nitrates differ? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 34 (1992), Suppl 1, 5S–9S.
- [8] Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., Roth, H.J.: Medizinische Chemie. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart (2005).
- [9] Miller, M.R., Megson, I.L.: Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007), 305–321.
- [10] Megson, I.L., Leslie, S.J.: LA-419, a nitric-oxide donor for the treatment of cardiovascular disorders. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10 (2009), 276–285.
- [11] Chen, G., Wang, H., Robinson, H., Cai, J., Wan, Y., Ke, H.: An insight into the pharmacophores of phosphodiesterase-5 inhibitors from synthetic and crystal structural studies. *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008), 1717–1728.
- [12] Rotella, D.P.: Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002), 674–682.
- [13] Sung, B.J., Hwang, K.Y., Jeon, Y.H., Lee, J.L., Heo, Y.S., et al.: Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules. *Nature* 425 (2003), 98–102.
- [14] Porst, H.: Erectile dysfunction. New drugs with special consideration of the PDE 5 inhibitors. *Urologe A* 43 (2004), 820–828.
- [15] Choi, H., Lee, J., Kim, Y.H., Im, D.S., Hwang, I.C., et al.: Discovery of potent, selective, and orally bioavailable PDE5 inhibitor: Methyl-4-(3-chloro-4-methoxybenzylamino)-8-(2-hydroxyethyl)-7-methoxyquinazolin-6-ylmethylcarbamate (CKD 533). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010), 383–386.
- [16] Konstantinos, G., Petros, P.: Phosphodiesterase-5 inhibitors: future perspectives. *Curr. Pharm. Des.* 15 (2009), 3540–3551.
- [17] Uthayathas, S., Karuppagounder, S.S., Thrash, B.M., Parameshwaran, K., Suppiramaniam, V., Dhanasekaran, M.: Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications. *Pharmacol. Rep.* 59 (2007), 150–163.
- [18] Hughes, R.O., Rogier, D.J., Jacobsen, E.J., Walker, J.K., MacInnes, A., Bond, B.R., et al.: Design, synthesis, and biological evaluation of 3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-7-(6-methoxypyridin-3-yl)-1-(2-propoxyethyl)pyrido[3,4-b]pyrazin-2(1H)-one, a potent, orally active, brain penetrant inhibitor of phosphodiesterase 5 (PDE5). *J. Med. Chem.* (2010), 53, 2656–2660.

#### Die Autoren:



Carolin Roegler (geb. 1978); 1997–2001 Studium der Pharmazie an der Universität Bonn; 2003 Approbation als Apothekerin; 2003–2006 angestellte Apothekerin in der Schloß Apotheke, Ismaning bei München; seit 10/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis von Prof. Lehmann am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie.



Prof. Dr. Jochen Lehmann (geb. 1944); Studium der Chemie, Promotion zum Dr. rer. nat., Studium der Pharmazie und Habilitation in Bonn; 1983–1984 Professuren für Pharmazeutische Chemie in Bonn, 1985–1990 in Hamburg; 1990–2002 in Bonn; 1998–2002 Vorsitzender der Regionalgruppe Rheinland der DPhG; ab 2002 Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie und Direktor des Instituts für Pharmazie der Universität Jena (bis 2005).

#### Anschrift:

Prof. Dr. Jochen Lehmann  
Institut für Pharmazie  
Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie  
Philosophenweg 14  
07743 Jena  
j.lehmann@uni-jena.de

## Publikation 6

### **A novel class of nitrovasodilators – Potency and in vitro tolerance of organic aminoalkylnitrates.**

Roegler, Carolin; Koenig, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen.

*Journal of Cardiovascular Pharmacology* **2010**, eingereicht.

In Veröffentlichung 6 wurden Vertreter aus der Klasse der Aminoalkylnitrate vergleichend auf ihre Gefäßrelaxation und *in vitro* Toleranz untersucht. Nachdem bereits in Veröffentlichung 4 bisher gültige Paradigmen hinsichtlich Wirkstärke, Toleranzentwicklung und Bioaktivierung durch zwei Aminoalkylnitrate in Frage gestellt wurden, wurden nun Struktur-Wirkungsbeziehungen von Aminoalkylnitraten ermittelt werden. Es erfolgte die Synthese von 15 organischen Aminoalkylnitraten sowie die pharmakologische Charakterisierung der Verbindungen in Organbadexperimenten.

**Eigenanteil:** Synthese und Aufreinigung der organischen Nitrate, Durchführung der experimentell-pharmakologischen Untersuchungen, Auswertung der Daten, Erstellen des Manuskripts.



## A Novel Class of Nitrovasodilators

### -Potency and *in vitro* Tolerance of Organic Aminoalkylnitrates-

Carolin Roegler, MS\*, Andreas König, PhD\*, Erika Glusa, MD\*, and Jochen Lehmann, PhD\*<sup>†</sup>

\* Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany

<sup>†</sup> College of Pharmacy, King Saud University Riyadh, Saudi Arabia

#### Abstract

Experimental studies on organic alkylnitrates have shown that both vasodilator potency and development of *in vitro* tolerance (tachyphylaxis) correlate with the number of nitrate groups in the molecule. However, introduction of an aminogroup to ethylnitrate yielded 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (**1**), which is highly active but without inducing *in vitro* tolerance. Therefore, we prepared a series of aminoalkylnitrates and investigated vasorelaxation and tachyphylaxis on isolated PGF<sub>2α</sub>-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. Tachyphylaxis was studied by incubating the arteries with EC<sub>100</sub> of the respective aminoalkylnitrate and, after 45 min washout-phase, measuring vasorelaxation again. All of the aminoalkylnitrates caused vasodilation, but the effect did not correlate with the number of nitrate moieties in the molecule. None of the substances was able to outperform compound **1**, not even oligonitrates. Generally, structure-activity relationships (SAR) found for alkylnitrates are obviously not valid for aminoalkylnitrates. Whereas the most potent aminomononitrate **1** evokes no *in vitro* tolerance, others exhibit tachyphylaxis independently of their vasodilator potency. We have shown that vasorelaxant activity and induction of tachyphylaxis are modulated significantly by introduction of an amino group to the alkylnitrate scaffold. Our results indicate that aminoalkylnitrates have to be considered as an individual class of nitrovasodilators with different SAR and vasodilator properties.

Key Words: organic nitrates – vasorelaxation – structure-activity relationships – nitrate tolerance

## INTRODUCTION

Organic nitrates are used commonly in the therapy of cardiovascular diseases. The relaxing effects on vascular smooth muscle are mediated by multifactorial processes. After bioactivation of the nitrates in the smooth muscle cells, the released nitric oxide (NO) and/or related species activate soluble guanylyl cyclase (sGC) leading to accumulation of intracellular cyclic Guanosinmonophosphat (cGMP).<sup>1</sup> This increase causes a subsequent activation of a cGMP dependent protein kinase (cGK-I), which phosphorylates  $\text{Ca}^{2+}$  transporters resulting in vasodilation.<sup>2</sup> The underlying processes of NO generation are still under discussion. Involvement of different enzymes was suggested for the bioactivation of organic nitrates. The key enzyme for glyceryl trinitrate (GTN) bioactivation was identified by *Chen et al.* to be the mitochondrial isoform of aldehyde dehydrogenase (ALDH-2).<sup>3</sup> It has been shown that ALDH-2 activates vasoactive highly potent organic nitrates like GTN, pentaerythrityl tetranitrate (PETN) and pentaerythrityl trinitrate (PETriN).<sup>4</sup> Vasoactive low potent organic nitrates such as isosorbide dinitrate (ISDN) and isosorbide mononitrate obviously undergo a different pathway for bioactivation. The involvement of cytochrome P450 enzymes in the endoplasmatic reticulum has been suggested for activation of those.<sup>5</sup>

The continuous therapy with an organic nitrate like GTN leads rapidly to loss of vasodilator potency, so called nitrate tolerance. The development of nitrate tolerance is not yet completely understood. Increased oxidative stress, endothelial dysfunction or sympathetic activation may play an important role. Two different mechanisms are discussed. Early theories based upon the assumption that oxidation of sulfhydryl groups involved in the bioactivation lead to an attenuated reaction of the vessels to GTN application.<sup>6</sup> Another hypothesis correlates the appearance of tolerance with generation of oxidative stress and, therefore, with reduced bioavailability of NO.<sup>7</sup>

In contrast to GTN, PETN does not develop nitrate tolerance when given repeatedly in clinical practice. In contrast to this, in *in vitro* vasodilation studies (organ bath) PETN induces a significant *in vitro* tolerance (tachyphylaxis) whereas its partially denitrated metabolites pentaerythrityl dinitrate (PEDiN) and pentaerythrityl mononitrate (PEMonoN) did only weakly or not. The discrepancy of *in vivo* and *in vitro* tolerance can be explained by the low bioavailability of PETN.<sup>8</sup> Furthermore, PETN like GTN increases the generation of reactive oxygen species in isolated mitochondria but fails to induce oxidative stress *in vivo*.<sup>9</sup> This phenomenon can be explained by the finding that PETN is able to increase the expression of heme oxygenase-1 (HO-1), an enzyme possessing a superior antioxidative profile. The key role of HO-1 in the development of nitrate tolerance became apparent in a study demonstrating that combining GTN with a HO-1 activator prevents from tolerance *in vivo*.<sup>10</sup>

In a preliminary study we have shown that not only the number of nitrate groups but also the molecular structure including the stereochemistry of the whole organic nitrate molecule influences the vascular response to organic nitrates. In pharmacological experiments with several organic



mononitrates using  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -precontracted porcine pulmonary arteries we identified the mononitrate 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (compound **1**) as a highly potent vasodilator comparable to GTN.<sup>11</sup>

Besides, Schuhmacher et al. demonstrated that this highly active mononitrate is free of tachyphylaxis whereas triethylammoniumtrinitrate, a less potent organic trinitrate, elicits *in vitro* tolerance.<sup>12</sup> Obviously, the preliminary results with these two aminoalkylnitrates did not show the distinct correlation between the number of nitrate groups and the biological activity and induction of *in vitro* tolerance, respectively, as it was found for alkylnitrates<sup>4,13</sup>.

These results prompted us to look at aminoalkylnitrates in general. We synthesized a series of different examples and investigated structure-activity relationships (SAR), structure-tachyphylaxis and activity-tachyphylaxis relationships.

## MATERIALS AND METHODS

### *Substances*

In the literature, several methods have been applied for the synthesis of organic nitrates. In this study, the organic aminoalkylnitrates **1-15** (Table 1) were synthesized by esterification of the corresponding aminoalcohols with fuming nitric acid either in different solvents or in absence of any solvent. The following drugs were prepared according to procedures described in the literature:<sup>14-17</sup> **1** from 2-aminoethanol, **3** from 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol, **4** from 3-aminopropane-1,2-diol, **5** from 2-(dimethylamino)ethanol, **6** from triethanolamine, **7** from 2-aminopropane-1,3-diol, **8** from diethanolamine, **9** from 2-aminopropane-1-ol, **10** from 1-aminopropane-2-ol, **10** from L-serine, **12** from 2-(methylamino)ethanol, **13** from 3-aminopropane-1-ol, **14** from diisopropanolamine and **15** from 2-aminocyclohexanol. The salt **2** was obtained via extraction of the free base from **1** and adding etheric hydrochloric acid.

The following drugs were purchased: bradykinin triacetate and prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ; Serva, Heidelberg, Germany), 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; Sigma, Deisenhofen, Germany), glyceryl trinitrate (Merck, Darmstadt, Germany)

### *Tissue preparation*

According to a previously described protocol,<sup>18</sup> lungs from adult pigs were obtained from a local slaughterhouse. Small branches of pulmonary arteries were cleared from parenchyma and connective tissue. The vessels were kept in modified Krebs-Henseleit solution containing the following compounds [mM]: NaCl 118, KCl 4.7,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25.0 and glucose 11.5 (pH 7.4). Arteries to be used next day were stored in the refrigerator at 4°C overnight.

### *Measurement of vascular tone*

Pulmonary arteries were cut into small rings (2-3 mm long, 1-2 mm diameter). After suspending the rings between two L-shaped platinum hooks they were mounted in 10 mL organ baths filled with modified Krebs-Henseleit solution. The solution was kept at 37°C and aerated with a mixture of 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. The rings were precontracted with PGF<sub>2α</sub> (3 μM) with a resting tension of 20 mN, which equates 2 g. The vessels were allowed to equilibrate for 60 min, thereafter contractions were induced in 45 min intervals. At the beginning the rings were contracted with KCl (45 mM) followed by contraction with PGF<sub>2α</sub> (3 μM). Contractions were repeated 2-3 times until they were consistent. Integrity of the endothelium was estimated by bradykinin (10 nM) induced relaxation of precontracted vessels. Only vessels with intact endothelium were used. After achieving the plateau of PGF<sub>2α</sub>-induced contraction, which had to reach a tension of at least 4 g, the test compounds were added to the organ bath in a cumulative manner. Relaxation responses were expressed as a percentage of the PGF<sub>2α</sub> (3 μM)-induced contraction in each tissue.

### *Measurement of in vitro tolerance*

To examine the relaxation responses after a repeated exposure of the vessels to the organic nitrates a previously published protocol was used.<sup>13</sup> The vasodilator substances were given cumulatively up to a maximum relaxation of 100%. After 30 min, a washout phase of 45 min followed (3 times changing the medium) and thereafter, the concentration response curve was measured again. The second PGF<sub>2α</sub>-induced contraction had to reach a tension of at least 3 g and 75% of the first contraction plateau to be considered suitable for recording a second concentration relaxation curve.

### *Data analysis*

Data are given as means ± SEM for tissues from n animals. Agonist concentration response curves were constructed using GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA). The calculated pD<sub>2</sub> presented the negative logarithm of the molecular concentration producing 50% of the maximum response (EC<sub>50</sub>). Results were compared using one-way ANOVA following Bonferroni's Post Test for comparison of multiple means. *P* values <0.05 were considered to be significant.

## **RESULTS**

### *Vasorelaxant effects*

The tested aminoalkylnitrates caused a significant vasorelaxation in a concentration dependent manner (Fig. 1A, B). The sigmoidal concentration response curves were consistent with the Hill slope for these aminoalkylnitrates. All of the compounds were able to elicit the maximum vasorelaxation (*E*<sub>max</sub> ~ 100%) except compound **14** (~ 90%) and compound **15** (~ 75%) after addition of the appropriate maximum concentration of 3 mM. Although the vasodilator response is independent from the integrity of the endothelium, only vessels with intact endothelium were used. To ensure that relaxation is mediated by activation of the soluble guanylyl cyclase (sGC), the vessels were preincubated with

ODQ, a selective inhibitor of sGC. The treatment with 10  $\mu$ M ODQ before applying the nitrate shifted the vasorelaxation curves significantly to the right (data not shown).

In previous studies with alkylnitrates and hydroxyalkylnitrates including PEMonoN, PEDiN and PETriN, which probably are the active metabolites of the not bioavailable PETN, we have shown that the vasorelaxant activity of the organic nitrates increases with the number of nitrate groups in the molecule.<sup>19</sup> These SAR are obviously not valid for the class of the aminoalkylnitrates. Neither the tested aminoalkylmononitrates nor the aminoalkyloligonitrates were superior to the highly active mononitrate derivative **1** (Table 1).

To exclude any enhancement of vasodilator activity by the inorganic ionic nitrate in salt **1**, the hydronitrate was transferred to a hydrochloride (**2**). Compound **2** exerted the same effects as compound **1** indicating that the inorganic nitrate anion does not interfere with the vasodilator reactivity. Based on these findings, all other compounds with exception of compound **6**, which remained uncharged, were applied to the organ chamber as hydronitrates.

Methylation of the alkylchain in  $\alpha$ - or  $\beta$ -position in compounds **9**, **10** and **14** led to a majorly decreased vasodilating effect of the nitrates. Extension of the chain length in compound **13** reduces the vasodilator effect also dramatically. Adding an acidic carboxy group to the basic amino moiety, which is given in the derivative of L-serine (**11**) did not improve vasodilating activity. Embedding of the nitrate moiety in a rigid cyclic system as done in compound **15** led to a weak vasorelaxant effect, possibly due to impaired mobility of the molecule and thus reduced reactivity towards bioactivating enzymes.

The tertiary amine **6** containing three nitrate groups was not superior to the only dinitrated secondary amine **8**. The potency of the trinitrated TRIS-buffer (**3**) was in the same range with other trinitrates like GTN or PETriN.<sup>13</sup> Monomethylation (**12**) and N-dimethylation (**5**) of compound **1** also diminishes vasodilator response, the monomethylated compound being even more than two orders of magnitude less effective than **1**. Compared to nitrates bearing a primary aminogroup, secondary and tertiary amines are diminished in their vasorelaxant properties.

Compounds **4** and **7**, both glyceryl dinitrate (GDN) analogues, were nearly as potent as other dinitrates like isosorbide dinitrate or the active metabolites of GTN.<sup>11;19</sup> The derivative with a terminal primary amino group (**4**) was a stronger vasodilator than that with the central amino group between the adjacent nitrate moieties.

### ***Tachyphylaxis***

So far, development of tachyphylaxis or *in vitro* tolerance was generally considered to be dependent on the number of nitrate moieties in the molecule and, since potency and tachyphylaxis are correlated as well, on the potency of the organic nitrate, respectively.<sup>13</sup> Contrary to this, we have recently identified **1** as a highly active organic mononitrate but being devoid of *in vitro* tolerance and a low

potent organic trinitrate **6** but inducing *in vitro* tolerance.<sup>12</sup> These findings and the results of the structure-vasodilator activity relationships prompted us to investigate more in detail the appearance of *in vitro* tolerance in this class of basic aminoalkylnitrates. As shown in Table 2 the investigations of tachyphylaxis led to quite divergent results.

Compound **1** did not induce *in vitro* tolerance in organ bath studies on porcine pulmonary arteries (Fig. 2), which is in accordance with previous studies on isolated murine vessels.<sup>12</sup> Unexpectedly, the two N-methylated derivatives **5** and **12** differed in their behavior. While the more effective compound **5** did not show *in vitro* tolerance, the weaker vasodilator **12** produces a significant rightward shift of the concentration-response curve in the repeated measurement.

Furthermore, although compounds **9** and **10** elicit nearly the same vasodilator response, there were differences in the development of tachyphylaxis (Fig 3). Whereas the methylation next to the amino group in **10** did lead to tachyphylaxis, a methylation near the organic nitrate moiety (**9**) did not.

Among the aminoalkyldinitrates (compounds **4**, **7** and **8**; Fig. 4) the two glyceryl dinitrate analogues **4** and **7** did not induce a significant *in vitro* tolerance contrary to compound **8**, a sort of a dimer of compound **1**.

As expected, application of both aminoalkyltrinitrates **3** and **6** produced tolerant vessels (Fig. 5). This is in accordance with previous findings that trinitrates such as GTN and PETriN induce tachyphylaxis, but not in accordance with the previously found the “rule” that low potency nitrates – and **3**, **6** are one of those - usually are devoid of *in vitro* tolerance.<sup>13</sup>

Repeated application of both low potent nitrates **14** and **15** did not significantly affect vasorelaxant effect (curves not shown). Substances **11** and **13** were excluded from the study due to the instability of the compounds.

## DISCUSSION

We have characterized 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a highly potent, *in vitro* tolerance free vasodilator of porcine lung arteries, which stands in contrast to the previously established SAR rules for organic nitrates that only oligonitrates and not mononitrates can be very potent nitrates and that only weak nitrovasodilators can be devoid of *in vitro* tolerance. So far, absence of *in vitro* tolerance could only be demonstrated for low potent organic nitrates like ISMN, ISDN and partially denitrated metabolites of PETN and GTN. However, the *in vivo* tolerance-devoid profile of PETN can be possibly explained by the hypothesis that only its metabolites PEDiN and PEMonoN but not PETN and PETriN are bioavailable *in vivo*.<sup>13</sup> Therefore, it was of interest to get more insights into this class of organic nitrates and investigate the properties of a series of aminoalkylnitrates with regard to vasodilation and *in vitro* tolerance profile. In pharmacological experiments using porcine pulmonary arteries, we studied aminoalkylnitrates different in number of nitrate moieties and alkylsubstitution.

With regard to vasodilation, no general rules for the correlation of structure and efficacy could be found, even no dependency of potency and number of organic nitrate moieties in the molecule, which was well recognized for alkyl nitrates. The 2-amino-substituted mononitrate **1** still proved to be the most potent compound with a  $pD_2 = 7.52$ . None of the synthesized aminoalkyldi- and trinitrates was able to outperform the vasorelaxant activity of **1**. In fact, there is no correlation concerning the number of nitrate groups and the potency. So the present data demonstrate that SAR observed for alkyl nitrates are not valid for aminoalkyl nitrates.

Since compounds **6** and **8**, which are sort of polymers of **1**, are less effective than **1**, we hypothesize that the primary amino group is crucial for highly potent vasodilators and activity decreases with increasing substitution on the nitrogen. Chemically, the primary amino group might improve affinity and reactivity towards the bioactivating enzyme or any other target molecule. This assumption is consistent with the high activity of **3** and **4** bearing a primary amino group, but non-conforming with the also high effective N-dimethylated compound **5**. On the other hand, the monomethylated compound **12** ( $pD_2 = 5.32$ ) did not elicit such a strong vasorelaxation. Generally, vasodilator potency is impaired for secondary and tertiary amines.

Markedly discrepancies appear among the GDN-analogues [1,2-derivative:  $pD_2 = 6.77$ ; 1,3-derivative:  $pD_2 = 5.97$ ] whose  $pD_2$ -values differ nearly one order of magnitude. They are in range with the potencies of the metabolites of GTN [1,2-GDN:  $pD_2 = 5.71$ ; 1,3-GDN:  $pD_2 = 6.28$ ],<sup>19</sup> but, unexpectedly, the order of efficacy of the GDN-analogues is reversed to that of the GTN-metabolites. Again, this could be influenced by the terminal primary amino group. Further variations of the substitution such as methylation, acylation of the alkylchain or embedding in a cyclic system did not lead to highly potent vasodilators.

In contrast to previous studies with alkyl nitrates,<sup>13</sup> no correlation between the number of nitrate groups and development of *in vitro* tolerance could be found among the aminoalkyl nitrates. Both trinitrates **3**, **6** and the dinitrate **8** but also the mononitrates **10**, **12** induced tachyphylaxis.

Even further “against the rules”, in the group of mononitrates, the weaker vasodilators (**10**, **12**) tended to induce *in vitro* tolerance rather than the more potent compounds (**1**, **5**). Moreover, out of two mononitrates (**9**, **10**) causing the same vasorelaxation when applied for the first time, one (compound **9**) loses its vasodilator activity when applied to the same vessel the second time, while the other (**10**) acts as potent as before. The GDN-analogues did not induce tachyphylaxis, while the dinitrated compound **8** elicited *in vitro* tolerance in contrast to its parent compound **1**. Finally, both trinitates clearly led to an attenuated response of the vessel.

The results of the present study demonstrate that the nitrate carrier molecule influences not only the potency but also the development of tachyphylaxis. Certainly, *in vitro* nitrate tolerance is not a consequence of high vasodilator potency (compare **1** to **6**), just as low potent nitrovasodilators are not generally devoid of *in vitro* tolerance. We have taken into account that bioactivation of compounds **1**

and **6** is different<sup>12</sup> and bioactivation might be involved in the development of tolerance. To investigate in detail the influence of bioactivation, preliminary *in vitro* studies with and without the ALDH-inhibitor benomyl were performed. Those studies indicated that indeed bioactivation and *in vitro* tolerance may be linked together. Thus, further studies will be necessary to verify this.

## CONCLUSION

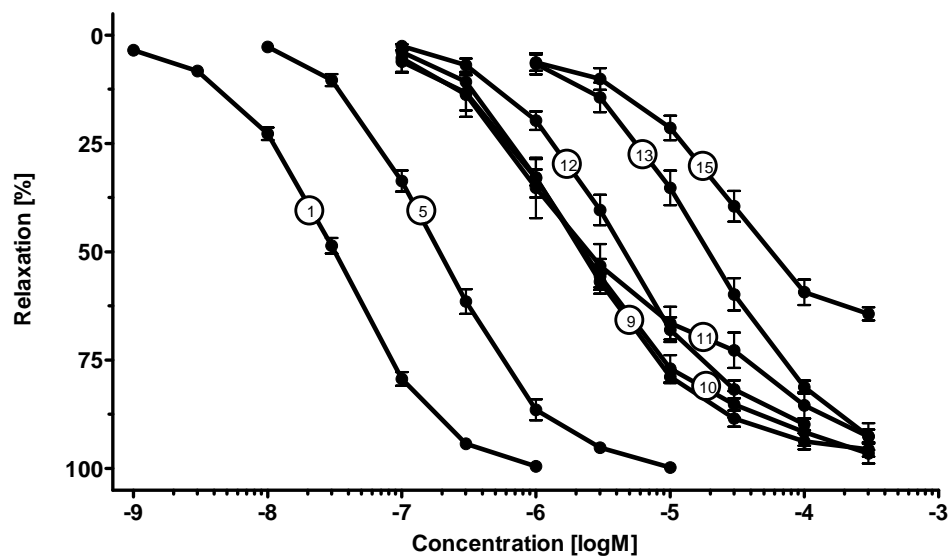
Taken together, we have shown that the vasorelaxant activity and the induction of *in vitro* tolerance are modulated significantly by introduction of an amino group to the alkylnitrate scaffold. The number of nitrate groups no longer can be considered as the exclusive determinant for vasodilator potency. Furthermore, *in vitro* tolerance is neither dependent on the potency of the applied nitrate nor on the number of nitrate functions in the molecule. Based on the data of the present study, one could not establish any rules that are universally valid for all tested organic aminoalkylnitrates. In conclusion, our results indicate that aminoalkylnitrates beyond alkylnitrates have to be considered as an own individual class of nitrovasodilators with different SAR and different vasodilator properties.

## Reference List

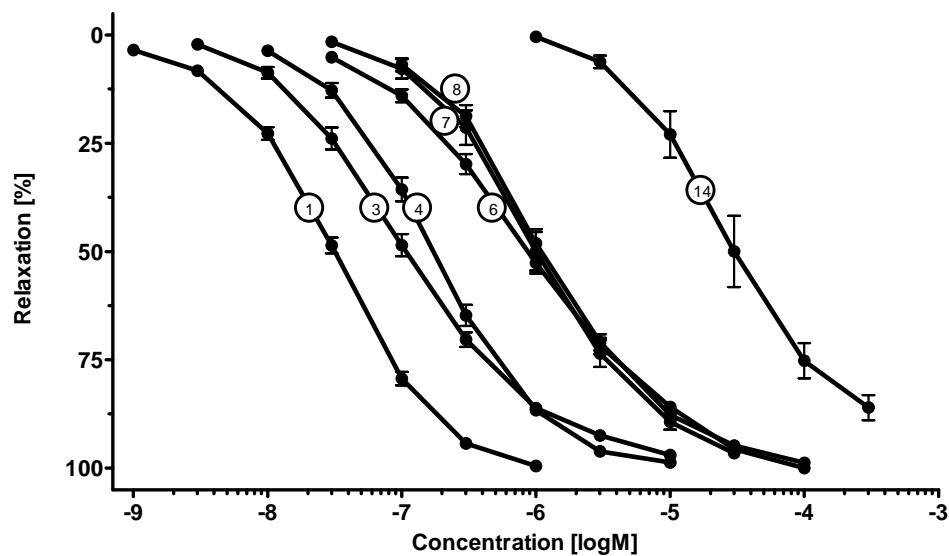
1. Murad, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999, 32, 1317-1327.
2. Daiber, A.; Wenzel, P.; Oelze, M.; Munzel, T. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clin. Res. Cardiol.* 2008, 97, 12-20.
3. Chen, Z.; Zhang, J.; Stamler, J. S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99, 8306-8311.
4. Wenzel, P.; Hink, U.; Oelze, M.; Seeling, A.; Isse, T.; Bruns, K.; Steinhoff, L.; Brandt, M.; Kleschyov, A. L.; Schulz, E.; Lange, K.; Weiner, H.; Lehmann, J.; Lackner, K. J.; Kawamoto, T.; Munzel, T.; Daiber, A. Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: a proof of concept study in ALDH-2<sup>-/-</sup> mice. *Br J Pharmacol* 2007, 150, 526-533.
5. Munzel, T.; Daiber, A.; Mulsch, A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res* 2005, 97, 618-628.
6. Needleman, P.; Jakschik, B.; Johnson, E. M., Jr. Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1973, 187, 324-331.
7. Munzel, T.; Sayegh, H.; Freeman, B. A.; Tarpey, M. M.; Harrison, D. G. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 1995, 95, 187-194.
8. Kojda, G.; Hacker, A.; Noack, E. Effects of nonintermittent treatment of rabbits with pentaerythritol tetranitrate on vascular reactivity and superoxide production. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 355, 23-31.
9. Daiber, A.; Oelze, M.; Coldewey, M.; Bachschmid, M.; Wenzel, P.; Sydow, K.; Wendt, M.; Kleschyov, A. L.; Stalleicken, D.; Ullrich, V.; Mulsch, A.; Munzel, T. Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol* 2004, 66, 1372-1382.
10. Wenzel, P.; Oelze, M.; Coldewey, M.; Hortmann, M.; Seeling, A.; Hink, U.; Mollnau, H.; Stalleicken, D.; Weiner, H.; Lehmann, J.; Li, H.; Forstermann, U.; Munzel, T.; Daiber, A. Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27, 1729-1735.
11. Koenig, A.; Roegler, C.; Lange, K.; Daiber, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator. *Bioorg Med Chem Lett* 2007, 17, 5881-5885.
12. Schuhmacher, S.; Schulz, E.; Oelze, M.; Konig, A.; Roegler, C.; Lange, K.; Sydow, L.; Kawamoto, T.; Wenzel, P.; Munzel, T.; Lehmann, J.; Daiber, A. A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena. *Br J Pharmacol* 2009, 158, 510-520.
13. Koenig, A.; Lange, K.; Konter, J.; Daiber, A.; Stalleicken, D.; Glusa, E.; Lehmann, J. Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythritol tetranitrate. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007, 50, 68-74.
14. Barbière, J. Estérification nitrique et nitration d'amino-alcools. *Bull Soc Chim Fr* 1944, 11, 470-480.
15. Ishihara, S.; Saito, F.; Ohhata, Y.; Kanai, M.; Mizuno, H.; Fujisawa, M.; Yorikane, R.; Koike, H. Synthesis and collateral dilator activity of nitroxyalkylamides having direct or latent sulfhydryl moieties. *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 13, 1527-1530.
16. Ranatunge, R. R.; Augustyniak, M. E.; Dhawan, V.; Ellis, J. L.; Garvey, D. S.; Janero, D. R.; Letts, L. G.; Richardson, S. K.; Shumway, M. J.; Trocha, A. M.; Young, D. V.; Zemtseva, I. S. Synthesis and anti-inflammatory activity of a series of N-substituted naproxen glycolamides: nitric oxide-donor naproxen prodrugs. *Bioorg Med Chem* 2006, 14, 2589-2599.



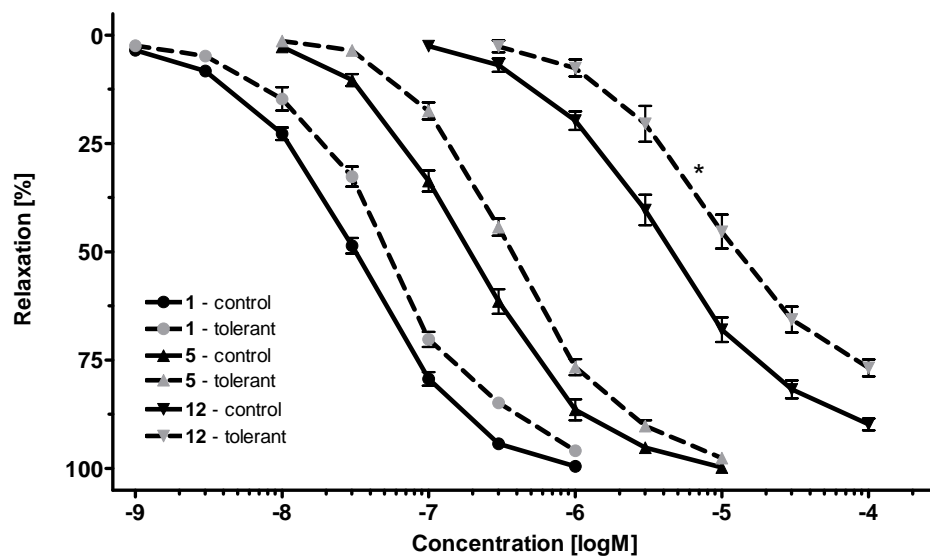
- 
17. Romanova, L. B.; Ivanovo, M. E.; Nesterenko, D. A.; Eremenko, L. T. Synthesis of nitroxyalkylammonium nitrates. *Russ Chem Bull* 1994, 43, 1207-1208.
  18. Glusa, E.; Adam, C. Endothelium-dependent relaxation induced by cathepsin G in porcine pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 2001, 133, 422-428.
  19. Lange, K.; Koenig, A.; Roegler, C.; Seeling, A.; Lehmann, J. NO donors. Part 18: Bioactive metabolites of GTN and PETN--synthesis and vasorelaxant properties. *Bioorg Med Chem Lett* 2009, 19, 3141-3144.



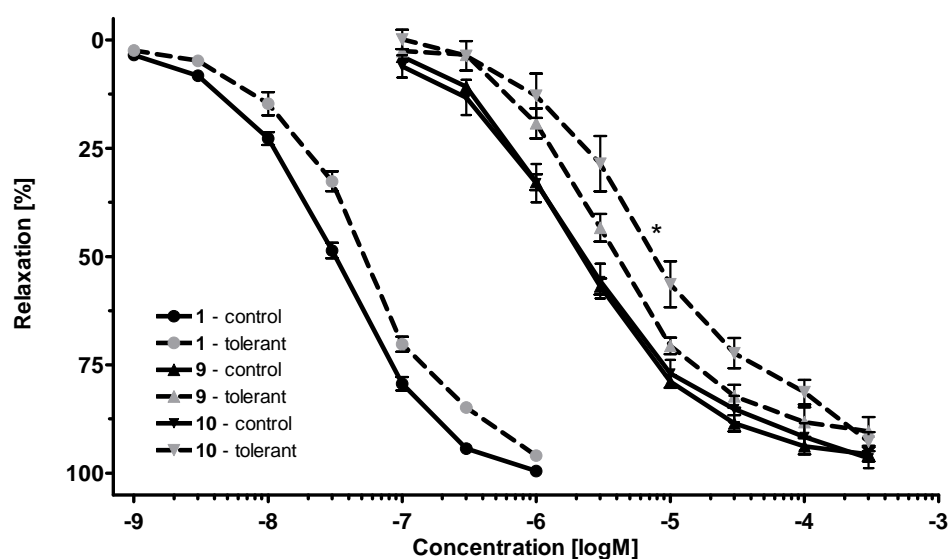
**Figure 1A** Concentration-response curves for vasorelaxation of aminoalkylmononitrates given in Table 1 on  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -precontracted porcine pulmonary arteries. Means  $\pm$  SEM



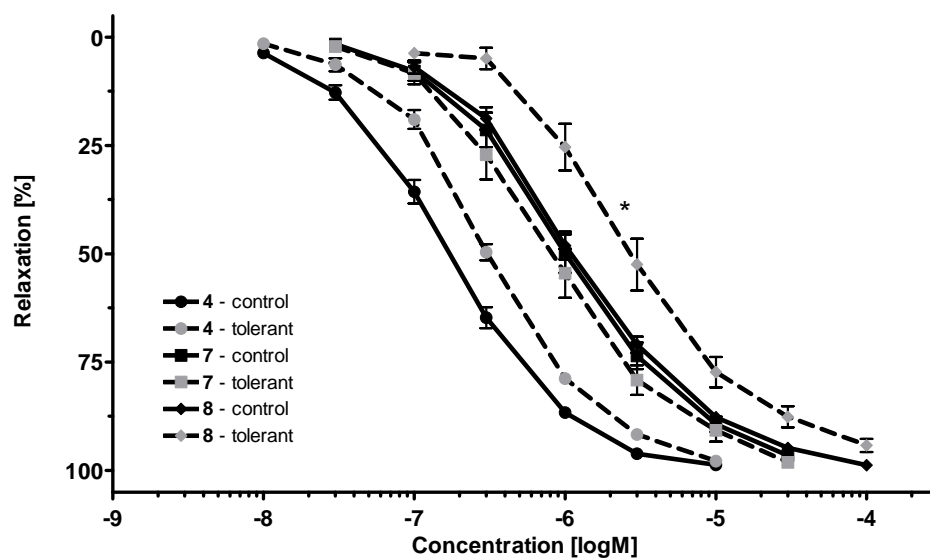
**Figure 1B** Concentration-response curves for vasorelaxation of aminoalkyloligonitrates given in Table 1 and compound 1 as reference on  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -precontracted porcine pulmonary arteries. Means  $\pm$  SEM



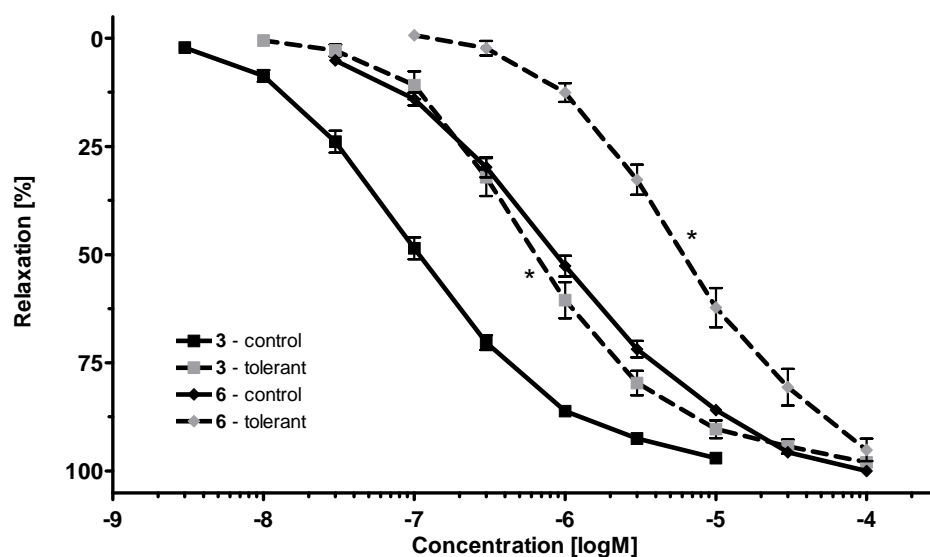
**Figure 2** Relaxation of 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (**1**) and its N-methylated derivatives (**5**, **12**) in control and tolerant  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \mu\text{M}$ )-precontracted porcine pulmonary arteries. \* indicates tolerant curves being significantly different from control ( $P < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SEM from 5-12 experiments.



**Figure 3** Relaxation of 2-nitrooxyethylammoniumnitrate (**1**) and its C-methylated derivatives (**9**, **10**) in control and tolerant  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \mu\text{M}$ )-precontracted porcine pulmonary arteries. \* indicates tolerant curves being significantly different from control ( $P < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SEM from 6-12 experiments.



**Figure 4** Relaxation of the ammoniumalkyldinitrates (4, 7, 8) in control and tolerant  $\text{PGF}_{2a}$  ( $3 \mu\text{M}$ )-precontracted porcine pulmonary arteries. \* indicates tolerant curves being significantly different from control ( $P < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SEM from 7-13 experiments.



**Figure 5** Relaxation of the ammoniumalkyltrinitrates (3, 6) in control and tolerant  $\text{PGF}_{2a}$  ( $3 \mu\text{M}$ )-precontracted porcine pulmonary arteries. \* indicates tolerant curves being significantly different from control ( $P < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SEM from 6-12 experiments.

**Table 1** Vasodilator activities (pD<sub>2</sub>-value and EC<sub>50</sub>) of organic mononitrates and GTN, on PGF<sub>2α</sub>-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium

Compound	Structure	pD <sub>2</sub> (±SEM)	EC <sub>50</sub> [M]	n
1		7.52 (±0.01)	3.02 x 10 <sup>-8</sup>	12
2		7.52 (±0.02)	3.05 x 10 <sup>-8</sup>	6
3		6.94 (±0.02)	1.14 x 10 <sup>-7</sup>	12
4		6.77 (±0.03)	1.73 x 10 <sup>-7</sup>	9
5		6.71 (±0.02)	1.92 x 10 <sup>-7</sup>	10
6		6.04 (±0.03)	9.08 x 10 <sup>-7</sup>	12
7		5.97 (±0.03)	1.06 x 10 <sup>-6</sup>	13
8		5.92 (±0.02)	1.19 x 10 <sup>-6</sup>	12
9		5.63 (±0.02)	2.37 x 10 <sup>-6</sup>	12
10		5.61 (±0.04)	2.48 x 10 <sup>-6</sup>	9
11		5.46 (±0.07)	3.49 x 10 <sup>-6</sup>	6
12		5.32 (±0.03)	4.79 x 10 <sup>-6</sup>	10
13		4.71 (±0.03)	1.97 x 10 <sup>-5</sup>	8
14		4.48 (±0.05)	3.30 x 10 <sup>-5</sup>	5
15		4.16 (±0.05)	6.88 x 10 <sup>-5</sup>	7
GTN		7.44 (±0.02)	3.56 x 10 <sup>-8</sup>	6

The pD<sub>2</sub>-value presents the negative logarithm of the molar concentration producing 50% of the maximum relaxation (EC<sub>50</sub>). Values are means ± SEM from n separate experiments.

**Table 2** Comparison of EC<sub>50</sub>-values for the relaxant responses of the aminoalkylnitrates on nontolerant (control) vessels and after preincubation with EC<sub>100</sub> (tolerant) in porcine pulmonary arteries

The ratio of EC<sub>50</sub> (tolerant) and EC<sub>50</sub> (control) represents the x-fold reduction of vasodilator potency

Compound	EC <sub>50</sub> [M] (control)	pD <sub>2</sub> (±SEM)	n	EC <sub>50</sub> [M] (tolerant)	pD <sub>2</sub> (±SEM)	n	$\frac{EC_{50}(\text{tolerant})}{EC_{50}(\text{control})}$
1	3.02 x 10 <sup>-8</sup>	7.52 (±0.01)	12	3.91 x 10 <sup>-8</sup>	7.28 (±0.02)	9	1.3
3	1.14 x 10 <sup>-7</sup>	6.94 (±0.02)	12	6.98 x 10 <sup>-7</sup>	6.16 (±0.03)	7	6.1
4	1.73 x 10 <sup>-7</sup>	6.77 (±0.03)	9	3.20 x 10 <sup>-7</sup>	6.50 (±0.02)	7	1.9
5	1.92 x 10 <sup>-7</sup>	6.71 (±0.02)	10	3.72 x 10 <sup>-7</sup>	6.43 (±0.01)	5	1.9
6	9.08 x 10 <sup>-7</sup>	6.04 (±0.03)	12	6.38 x 10 <sup>-6</sup>	5.20 (±0.03)	6	7.0
7	1.06 x 10 <sup>-6</sup>	5.97 (±0.03)	13	8.39 x 10 <sup>-7</sup>	6.08 (±0.04)	7	0.8
8	1.19 x 10 <sup>-6</sup>	5.92 (±0.02)	12	2.99 x 10 <sup>-6</sup>	5.52 (±0.04)	8	2.7
9	2.37 x 10 <sup>-6</sup>	5.63 (±0.02)	12	4.54 x 10 <sup>-6</sup>	5.34 (±0.04)	6	1.9
10	2.48 x 10 <sup>-6</sup>	5.61 (±0.04)	9	9.22 x 10 <sup>-6</sup>	5.04 (±0.05)	9	3.7
12	4.79 x 10 <sup>-6</sup>	5.32 (±0.03)	10	1.50 x 10 <sup>-5</sup>	4.82 (±0.04)	7	3.1
14	3.30 x 10 <sup>-5</sup>	4.48 (±0.05)	5	6.16 x 10 <sup>-5</sup>	4.21 (±0.04)	5	1.9
15	6.88 x 10 <sup>-5</sup>	4.16 (±0.05)	7	1.83 x 10 <sup>-4</sup>	3.74 (±0.03)	5	2.7





## D Unveröffentlichte Ergebnisse

In diesem Kapitel sind Untersuchungen und Ergebnisse zusammengefasst, die nicht in den Publikationen aus Kapitel C vorgestellt wurden. Es handelt sich hierbei um neue Resultate, die bisher noch nicht zur Veröffentlichung eingereicht worden sind oder Ergebnisse, die trotz inhaltlichen Zusammenhangs nicht in die vorliegenden Publikationen eingearbeitet wurden. Methoden, die speziell für diese Experimente entwickelt wurden oder erforderlich waren, werden in der jeweiligen Einführung aufgeführt.

### D.1 Nachhaltigkeit der Relaxation von Aminoalkylnitraten

#### *Methode*

Um die Nachhaltigkeit der Relaxation zu ermitteln, wurde geprüft, wie lange eine durch Nitratgabe herbeigeführte Gefäßdilatation anhält bzw. wie rasch es zu einer Erholung der relaxierten Gefäße kommt. Hierfür wurden ebenfalls experimentelle Untersuchungen im Organbad durchgeführt. Zu den mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vokontrahierten Pulmonalarterien wurde ein einmaliger Nitratbolus gegeben. Gemessen wurde nach der Zugabe sowohl die maximal erreichte Vasodilatation als auch die nach 20 min noch verbliebene Relaxation. Es wurde mit unterschiedlichen Versuchsprotokollen gearbeitet. Zur besseren Vergleichbarkeit des Relaxationsverhaltens wurde zum einen mit einer Konzentration inkubiert, die dem  $\text{EC}_{50}$ -Wert der jeweiligen Substanz entspricht, zum anderen wurde mit einer gleichbleibenden Konzentration inkubiert. Hiermit sollten die unterschiedlichen Wirkstärken der organischen Aminoalkylnitrate noch einmal verdeutlicht werden. Des Weiteren wurden ausgewählte Substanzen in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um eine Konzentrationsabhängigkeit der Nachhaltigkeit der Vasodilatation zu erkennen. Alle Versuche wurden mit Aminoalkylmononitraten durchgeführt.

#### *Ergebnisse*

Bei den ersten Versuchen wurden die Gefäße mit einem dem  $\text{EC}_{50}$ -Wert entsprechenden Nitratbolus inkubiert. Erwartungsgemäß zeigten alle eingesetzten Substanzen hierbei eine Vasodilatation von etwa 50 %. In *Abb. D-1* sind beispielhaft die Kurven zweier N-methylierter Aminoalkylnitrate dargestellt. Für das stärker wirksame dimethylierte Derivat liegt der  $\text{EC}_{50}$  bei  $1,92 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , für die schwächer wirksame monomethylierte Substanz bei  $4,79 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ .

Sowohl die Zeit bis zur maximal gemessenen Relaxation als auch der Verlauf beider Kurven nach ihrem relativen Minimum (also dementsprechend der maximalen Vasodilatation) sind

bei beiden Substanzen vergleichbar. Aus den erhaltenen Relaxationskurven ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Substanzen ableiten.

Daraufhin wurden alle Versuche nochmals mit einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-6}$  M durchgeführt, die bei allen getesteten Aminoalkylnitraten eine Vasodilatation hervorruft. Die Ergebnisse sind in *Tab. D-1* zusammengefasst. Die maximal nach der Bolusgabe gemessene Relaxation bestätigte die Wirkstärke der Nitrate auch bei nicht-kumulativer Gabe. Auffallend war lediglich die verhältnismäßig starke Antwort der Gefäße auf Substanz **6**, die nach dem experimentell ermittelten  $EC_{50}$ -Wert etwas schwächer hätte ausfallen sollen. Zudem wurde kein Unterschied zwischen den zwei wirkstärksten Nitraten (**1**, **2**) beobachtet. Dies lässt sich vermutlich damit erklären, dass die Vasodilatation für beide bei der eingesetzten Konzentration schon annähernd maximal war.

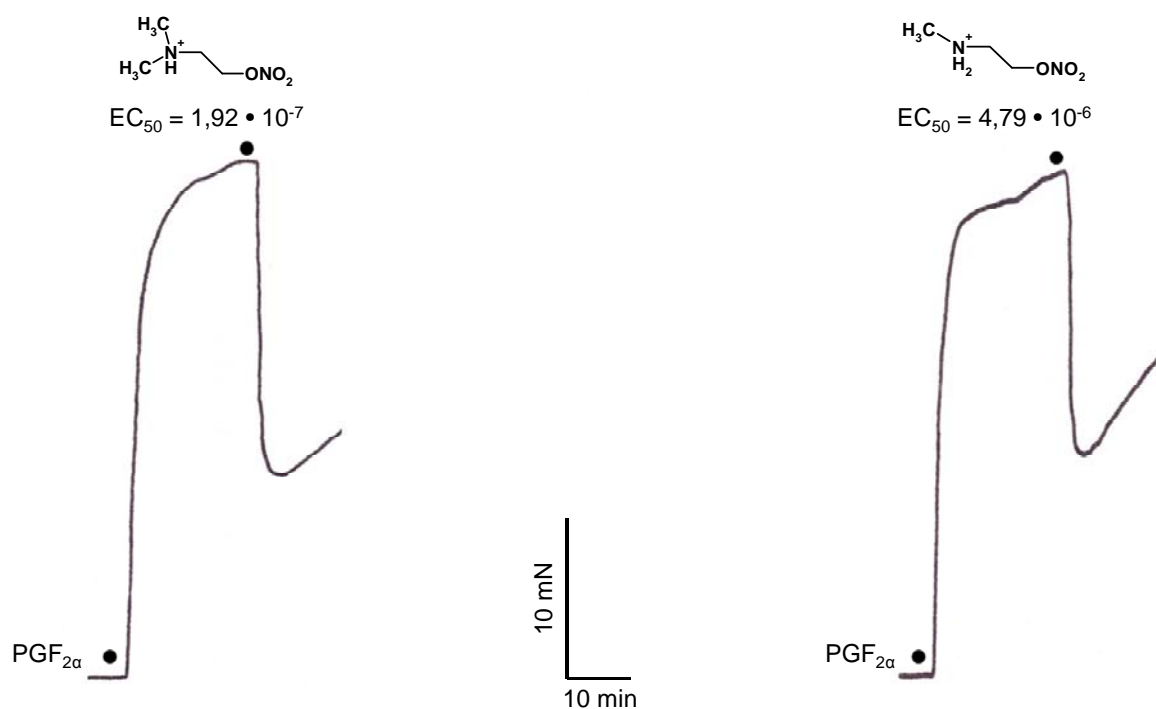


Abb. D-1: Vergleich der Relaxationskurven von *N*-Dimethylaminoethylnitrat (links) und *N*-Monomethylaminoethylnitrat (rechts) nach Inkubation mit  $EC_{50}$ .

Während bei den ersten Versuchen mit dem  $EC_{50}$ -Bolus keine deutlichen Differenzen im Relaxationsverhalten auszumachen waren, zeigten sich bei  $2 \cdot 10^{-6}$  M durchaus Unterschiede in der Vasodilatation. Es fiel auf, dass es nach Erreichen der maximal möglichen Relaxation Abweichungen in der Wiedererlangung der Kontraktion gab. Um herauszufinden, ob hierbei die Erholung der Gefäße von der eingesetzten Konzentration abhängt, wurden weitere Versuche mit Bolusgaben durchgeführt. Hierbei wurden das hochpotente Aminoethylnitrat (**1**) sowie das schwach wirksame *N*-Methylaminoethylnitrat (**5**)

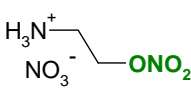
in Konzentrationen eingesetzt, die von der Auslösung einer geringen Vasodilatation bis hin zu einer annähernd maximalen Relaxation reichten (für Substanz **1**:  $1 \cdot 10^{-8} - 3 \cdot 10^{-6}$  M; für Substanz **5**:  $1 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-4}$  M). Verglichen wurde die Erholung des Gefäßes nach einer Inkubationszeit von 20 min als Maß für die Nachhaltigkeit der Relaxation.

Tab. D-1: Prozentuale Relaxation der  $PGF_{2\alpha}$ -vokontrahierten Schweinelungenarterie nach Inkubation mit  $2 \cdot 10^{-6}$  M des entsprechenden organischen Aminoalkylnitrats. Zur Orientierung sind ebenfalls die  $EC_{50}$ -Werte [M] sowie die  $pD_2$ -Werte der Nitrats angegeben (siehe Veröffentlichung 6).

	Substanz	$EC_{50}$ [M]	$pD_2$	Relaxation [%] $2 \cdot 10^{-6}$ M ( $\pm$ SEM)
<b>1</b>		$3,02 \cdot 10^{-8}$	7,52	93,5 ( $\pm$ 6,6)
<b>2</b>		$1,92 \cdot 10^{-7}$	6,71	89,2 ( $\pm$ 7,6)
<b>3</b>		$2,37 \cdot 10^{-6}$	5,63	63,8 ( $\pm$ 11,5)
<b>4</b>		$2,48 \cdot 10^{-6}$	5,61	62,9 ( $\pm$ 7,6)
<b>5</b>		$4,79 \cdot 10^{-6}$	5,32	32,0 ( $\pm$ 5,3)
<b>6</b>		$1,08 \cdot 10^{-5}$	4,97	30,0 ( $\pm$ 4,6)
<b>7</b>		$1,97 \cdot 10^{-5}$	4,71	9,5 ( $\pm$ 3,4)

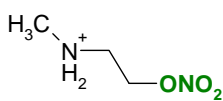
Bei Aminoethylnitrat zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Erholung des Gefäßes von der zugesetzten Konzentration. Bei einer geringen Konzentrationszugabe war das Gefäß 20 min später wieder in der Ausgangssituation, die Relaxation war also vollständig abgelaufen. Gab man eine dem  $EC_{100}$  entsprechende Konzentration hinzu, blieb das Gefäß auch noch nach 20 min vollständig dilatiert. Mit steigender Konzentration von Aminoethylnitrat sinkt also die Fähigkeit zur Wiedererlangung der Kontraktion bzw. verlängert sich die Dauer der Relaxation (Tab. D-2).

Tab. D-2: Relaxationswerte [%] nach Bolusapplikation von Aminoethylnitrat an  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierten isolierten Arterien aus der Schweinelunge. Die Wiedererlangung der Kontraktion ist der Quotient aus der Relaxation nach 20 min und der maximal erreichten Relaxation.

Substanz	Konzentration [M]	Maximale Relaxation [%]	Relaxation, 20 min [%]	Wiedererlangung der Kontraktion [%]
	$1 \cdot 10^{-8}$	30,7	17,8	42,0
	$3 \cdot 10^{-8}$	48,2	26,2	45,8
	$1 \cdot 10^{-7}$	75,9	54,3	28,5
	$3 \cdot 10^{-7}$	87,2	79,2	9,2
	$1 \cdot 10^{-6}$	93,9	91,0	3,1
	$3 \cdot 10^{-6}$	96,0	97,9	0

Bei identischen Versuchen mit N-Methylaminoethylnitrat konnte diese Abhängigkeit der Wiedererlangung der Kontraktion von der applizierten Nitratkonzentration nicht festgestellt werden. Unabhängig von der Konzentration kam es nach 20 min zu einer ähnlich guten Erholung der Arterien, die Relaxation wurde also schneller wieder rückgängig gemacht (Tab. D-3).

Tab. D-3: Relaxationswerte [%] nach Bolusapplikation von N-Methylaminoethylnitrat an  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierten isolierten Arterien aus der Schweinelunge. Die Wiedererlangung der Kontraktion ist der Quotient aus der Relaxation nach 20 min und der maximal erreichten Relaxation.

Substanz	Konzentration [M]	Maximale Relaxation [%]	Relaxation, 20 min [%]	Wiedererlangung der Kontraktion [%]
	$1 \cdot 10^{-6}$	13,7	6,2	54,8
	$3 \cdot 10^{-6}$	40,3	13,4	66,8
	$1 \cdot 10^{-5}$	67,3	21,7	68,8
	$3 \cdot 10^{-5}$	78,3	21,7	72,3
	$1 \cdot 10^{-4}$	85,7	35,6	58,5
	$3 \cdot 10^{-4}$	85,0	26,6	68,8

Dieses Phänomen wurde nicht detaillierter untersucht, da die Gefäßantwort auf die ausgewählten Konzentrationen hinsichtlich der Nachhaltigkeit der Relaxation stark variierte. Es konnte keine eindeutige Konzentrations- und Substanzabhängigkeit herausgearbeitet werden.

## D.2 Vasoaktivität von NO-Donor-Statin-Hybridmolekülen

Statine sind Inhibitoren der HMG-CoA(3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A)-Reduktase und werden üblicherweise in der Therapie der Hypercholesterinämie eingesetzt. Durch die Hemmung dieses geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Cholesterinbiosynthese werden die Konzentrationen von LDL (Low Density Lipoprotein) und Triglyzeriden im Blut gesenkt.<sup>132</sup> Statine haben demzufolge einen positiven Einfluss auf die Entstehung einer Arteriosklerose und können somit auch zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse beitragen. Neben der Senkung des Lipidspiegels werden hier außerdem pleiotrope Effekte wie die Verbesserung der Endothelfunktion oder Reduktion des oxidativen Stresses als Faktoren diskutiert.<sup>133</sup> Aufgrund der Erkenntnis, dass der Lipidstoffwechsel möglicherweise eine Rolle in der Entstehung der Alzheimerschen Krankheit (AD) spielt, wurden die Prävention und Therapie der AD ebenfalls als Anwendungsmöglichkeit für Statine diskutiert.<sup>134</sup> Durch Verhinderung der Isoprenoidbiosynthese können Statine eine Bildung von  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ ) reduzieren und so auch zur Verhinderung der Plaque-Entstehung beitragen.<sup>135</sup> NO-Donoren können über die Regulation der sGC/cGMP-Signaltransduktion ebenfalls die Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung positiv beeinflussen.<sup>136</sup> Daher erschien es naheliegend, die Wirkprinzipien von Statinen und NO-Donoren zu verbinden und somit ihre pharmakologischen Aktivitäten miteinander zu vereinen.

In Kooperation mit Frau Claudia Lengfelder aus dem eigenen Arbeitskreis, die sowohl für die Synthese der Substanzen als auch für die Testung der Verbindungen zur Verhinderung der A $\beta$ -Aggregation verantwortlich war, wurden Nitrat-Statin-Hybridmoleküle untersucht. Die Verbindungen wurden entweder vom Lovastatin oder vom korrespondierenden Diol ausgehend dargestellt. Das Diol wurde mittels hydrolytischer Abspaltung der Lovastatin-Seitenkette erhalten. Anschließend wurden die Ausgangsprodukte mit Nitratopivalinsäure acyliert. Hierbei entstehen sowohl Simvastatin-Derivate als auch Derivate des Lovastatins (*Abb. D-2*).

Als potentielle Therapeutika der AD wurden diese neuartigen Hybridverbindungen mit Hilfe der Organbadmethode auf ihre Vasoaktivität untersucht. Verwendet wurden die einfach nitrooxylierten Statin-Derivate CL L 10 und CL L 11, sowie das organische Dinitrat CL L 59. Zum Vergleich wurden ebenfalls das zur Nitrooxylierung verwendete Acylierungsmittel, die Nitratopivalinsäure, und die beiden klinisch verwendeten organischen Nitrate ISMN und ISDN getestet.

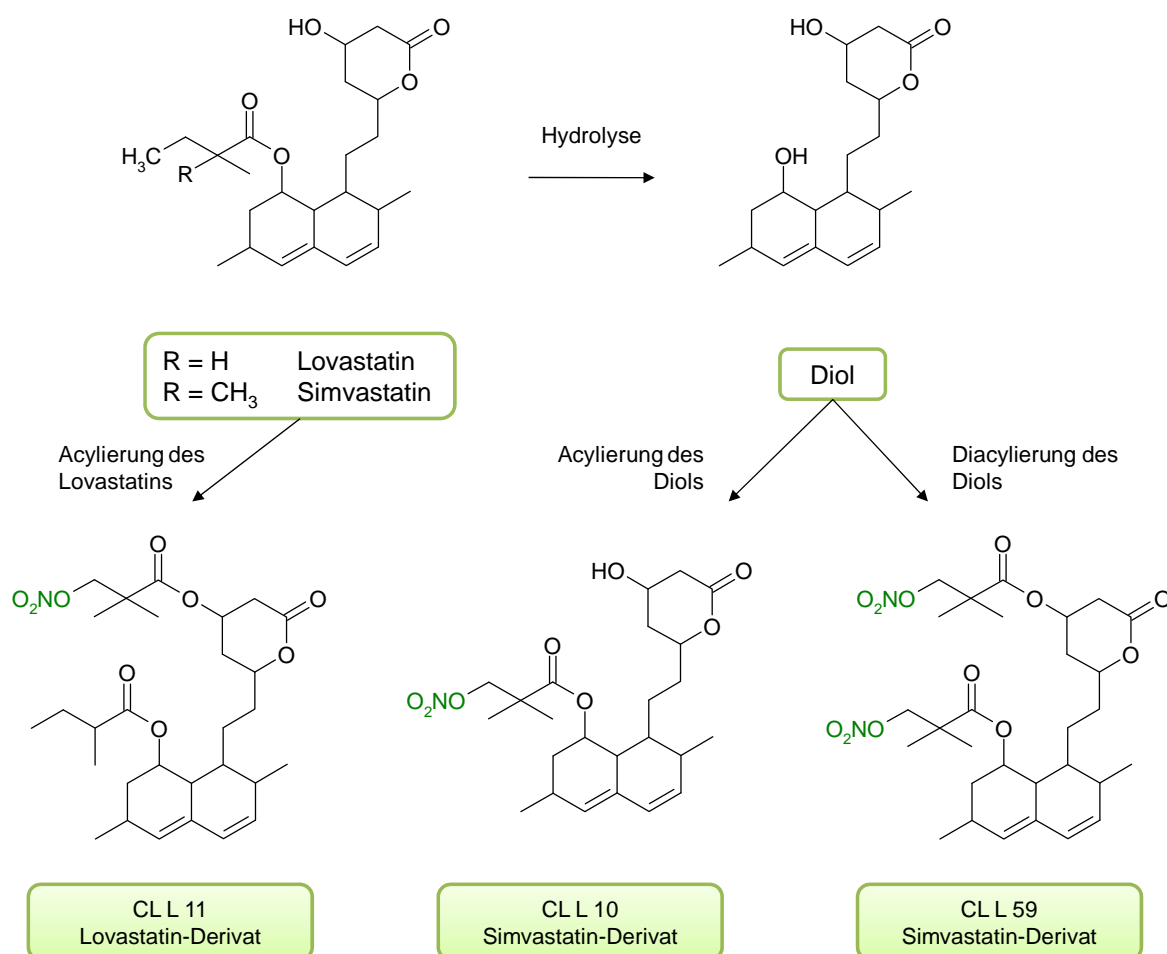
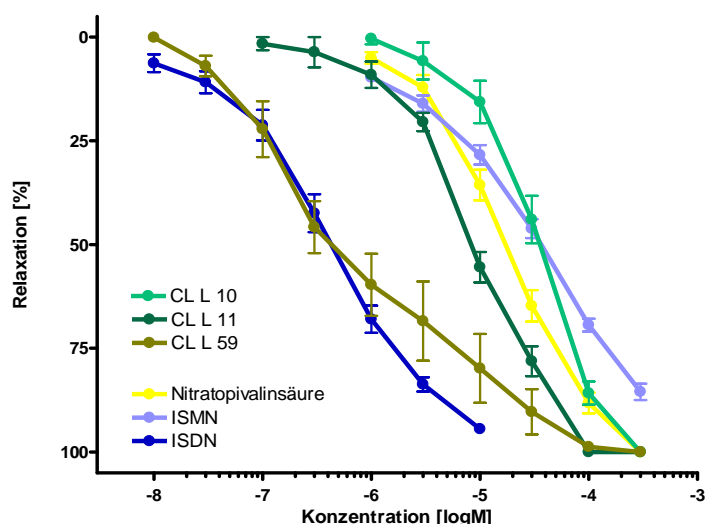


Abb. D-2: Die drei neuartigen Nitrat-Statin-Derivate bestehend aus Lovastatin bzw. Simvastatin mit unterschiedlicher Anzahl von Nitratgruppen (unten) sowie die Ausgangsstoffe Lovastatin, Simvastatin und das durch hydrolytische Spaltung erhaltene korrespondierende Diol (oben).

## Ergebnisse

Erwartungsgemäß rief das organische Dinitrat CL L 59 den stärksten vasorelaxierenden Effekt der drei getesteten Hybridverbindungen hervor (Abb. D-3). Mit einem  $EC_{50}$  von  $7,0 \cdot 10^{-7}$  M ist es in der Wirksamkeit vergleichbar mit dem ebenfalls zwei Nitratgruppen enthaltenden ISDN. Die Kurve der Hybridverbindung zeigt einen biphasischen Verlauf. Zu Beginn deckt sich die Konzentrations-Wirkungskurve mit der Relaxationskurve des ISDN. Ab einer Relaxation von ca. 50 % verläuft sie jedoch nicht mehr sigmoidal, sondern vorwiegend linear. Eine lineare Verlaufsform wird häufig durch unspezifische relaxierende Gefäßeffekte hervorgerufen. Dies ist möglicherweise mit der schlechten Löslichkeit der Substanz erklärbar. Durch die schlechte Wasserlöslichkeit des Statin-Restes musste die Verbindung in der Verdünnungsreihe mittels DMSO in Lösung gebracht werden. In höheren Konzentrationen kam es allerdings nach der Zugabe zu der Nährlösung im Organbad zu einer Präzipitation der Substanz. Bei den Mononitraten lagen die vasodilatierenden Effekte

von CL L 10 und CL L 11 im Bereich von ISMN und des Acylierungsmittels Nitratopivalinsäure. Zwar besitzen auch diese Hybridverbindungen eine schlechte Wasserlöslichkeit, jedoch kam es während der Messung nicht zur Wiederausfällung der Substanzen.



Verbindung	EC <sub>50</sub> [M]
CL L 10	$3,3 \cdot 10^{-5}$
CL L 11	$8,7 \cdot 10^{-6}$
CL L 59	$7,0 \cdot 10^{-7}$
Nitratopivalinsäure	$1,7 \cdot 10^{-5}$
ISMN	$3,2 \cdot 10^{-5}$
ISDN	$4,0 \cdot 10^{-7}$

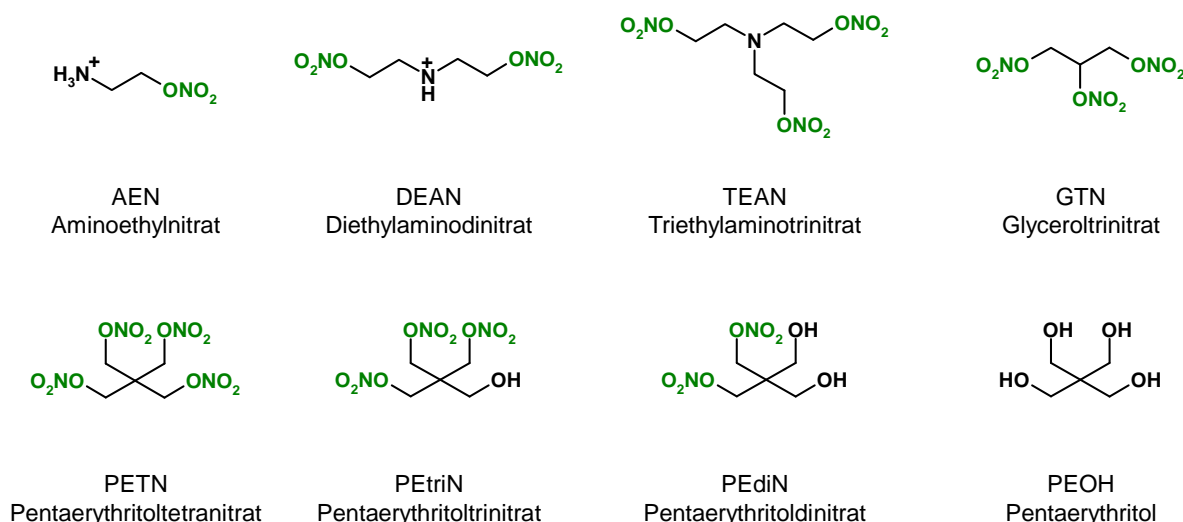
Abb. D-3, Tab. D-4: Konzentrations-Wirkungskurven der untersuchten Nitrat-Statin-Hybridverbindungen. Verbindung CL L 59 und ISDN enthalten zwei Nitratgruppen, CL L 10, CL L 11, ISMN sowie das Acylierungsmittel Nitratopivalinsäure enthalten je einen Nitratrest. Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3-6$ .

Die Ergebnisse zeigen, dass der vasorelaxierende Effekt der Hybridverbindungen hauptsächlich von der Anzahl der Nitratgruppen bestimmt wird. Trotz der voluminösen Reste unterscheiden sich die Aktivitäten der Verbindungen nicht signifikant im Vergleich zu klinisch verwendeten Mono- und Dinitraten. Die sterisch anspruchsvollen Statin-Grundgerüste haben demnach keinen Einfluss auf die Wirkstärke der Substanzen und führen nicht zu einer Verminderung der Affinität gegenüber den bioaktivierenden Enzymen.

### D.3 Untersuchungen der Hämoxygenase-1-Expression

Die Entwicklung einer Nitrattoleranz wird direkt mit der Entstehung von oxidativem Stress in vaskulärem Gewebe in Verbindung gebracht (siehe Abschnitt A.3.4.). Durch die Gabe verschiedener antioxidativer Substanzen konnte in diversen Studien eine Toleranzentstehung entweder rückgängig gemacht oder von vornherein verhindert werden.<sup>85</sup> Des Weiteren zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien mit PETN eine Hochregulierung des antioxidativ wirksamen Enzyms Hämoxygenase-1 (HO-1).<sup>117;124</sup> Durch die gleichzeitige Gabe des HO-1-Aktivators Hämin konnte außerdem eine Toleranzentwicklung durch GTN verhindert werden. Es wird daher vermutet, dass die Induktion der HO-1-Expression eine mögliche Ursache der Toleranzfreiheit von PETN ist. Nach der Charakterisierung von

Aminoethylnitrat (AEN) als toleranzfreies, hochpotentes organisches Mononitrat sowie Triethylaminotrinitrat als schwach wirksames Trinitrat, das Toleranz induziert (*siehe Publikation 4*), sollte die Expression der HO-1 nach Inkubation mit verschiedenen organischen Nitraten (*Abb. D-4*) untersucht werden. Es sollte ermittelt werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Toleranz und der Induktion der Expression der HO-1 besteht, was auch das toleranzfreie Wirkprofil des AEN erklären würde.



*Abb. D-4: Für die Versuche zur Hämoxygenase-1-Expression verwendete organische Nitrate sowie Pentaerythritol, das als Vergleichssubstanz ohne Nitratrest diente.*

## Methode

Menschliche Endothelzellen (EA.hy 926) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium in 6-Wellplatten angezüchtet.<sup>137</sup> Nach Erreichen von etwa 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen entweder mit Medium und Lösungsmittel (H<sub>2</sub>O für AEN, DEAN, PEdiN und PEOH; DMSO für TEAN, PETN, PETriN und Hämin; Ethanol für GTN) oder mit Medium und Testsubstanzen (AEN, DEAN, TEAN, PETN, PETriN, PEdiN, GTN und Hämin jeweils  $5 \cdot 10^{-5}$  M Endkonzentration) für 6 bzw. 12 h inkubiert. Zum Vergleich wurde ebenfalls Pentaerythritol ohne organischen Nitratrest als Negativkontrolle sowie der HO-1-Induktor Hämin als Positivkontrolle vermessen. Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen wurde die Guanidinisothiocyant/Phenol/Chloroform-Methode von *Chomczynski* und *Sacchi* verwendet.<sup>138</sup> Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt und es wurden RNase-freie Gefäße und Pipettenspitzen verwendet. Nachdem die RNA-Konzentrationen der Lösungen photometrisch mit dem Nano-Drop® ND-1000-Spektrometer bestimmt wurden, musste die RNA zur weiteren Untersuchung zunächst in einzelsträngige cDNA umgewandelt werden. Dies wurde mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Hierbei wurde die MultiScribe™ Reverse Transkriptase eingesetzt, die cDNA bei Verwendung von Random-Primern und bei Vorhandensein von



RNA synthetisiert. Die reverse Transkription wurde im Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt. Die daraus entstandene cDNA diente wiederum als Vorlage für die quantitative „real time“ Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Diese wird zur Quantifizierung einer spezifischen mRNA aus einer Gesamt-Zell-RNA eingesetzt. Sequenzspezifische Sonden (TaqMan-Sonden) ermöglichen die quantitative Bestimmung der mRNA-Menge. Die Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein – FAM) und an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher (Carboxytetramethylrhodamin – TAMRA oder TAM) markiert. Durch die räumliche Nähe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe in den Oligonukleotiden wird ein Fluoreszenzsignal unterdrückt. Die Taq-Polymerase spaltet die Sonde während der PCR, so dass nun ein Fluoreszenzsignal messbar wird, welches direkt proportional zur Menge der cDNA ist. Die Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich der Menge an HO-1-mRNA mit der Menge an mRNA des konstitutiv exprimierten Referenzgens GAPDH und wird prozentual zu dessen Expression angegeben. Die PCR wurde im iCycler (BioRad) durchgeführt und mittels der  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode ausgewertet.<sup>139</sup> Die verwendeten Primer und Sonden für die qRT-PCR sind in Tab. D-5 dargestellt.

Tab. D-5: humane Primer/Sonden-Sets für die quantitative „real-time“ PCR

Primer/Sonde	Sequenz
GAPDH sense	CCC ATG TTC GTC ATG GGT GT
GAPDH antisense	TGG TCA TGA GTC CTT CCA CGA TA
GAPDH Sonde	FAM-CTG CAC CAC CAA CTG CTT AGC ACC C-TAM
HO-1 sense	AGG CCA AGA CTG CGT TCC T
HO-1 antisense	GGC TCT GGT CCT TGG TGT CAT
HO-1 Sonde	FAM-CTC AAC ATC CAG CTC TTT GAG GAG TTG CAG-TAM

## Ergebnisse

Mit PETN, PETriN und TEAN behandelte menschliche Endothelzellen zeigten nach 6 h Inkubationszeit eine erhöhte Expression an für die HO-1 kodierender mRNA. Im Gegensatz dazu kam es nach der Behandlung der Zellen mit AEN, DEAN, PEDiN, GTN und der Trägersubstanz PEOH nicht zu einer erhöhten Expression der HO-1-mRNA. Die Positivkontrolle Hämin stimulierte wie erwartet die Bildung von mRNA in hohem Maß (Abb. D-5). Es konnte also in diesen Versuchen die bereits in früheren Studien gefundene Induktion der HO-1 durch PETN und PETriN bestätigt werden.<sup>115;124</sup> Auch durch GTN wurde eine leicht verstärkte Expression der HO-1-mRNA hervorgerufen, die jedoch im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant war. Zu einer signifikanten Hochregulierung kam es nach der Behandlung der Zellen mit TEAN.

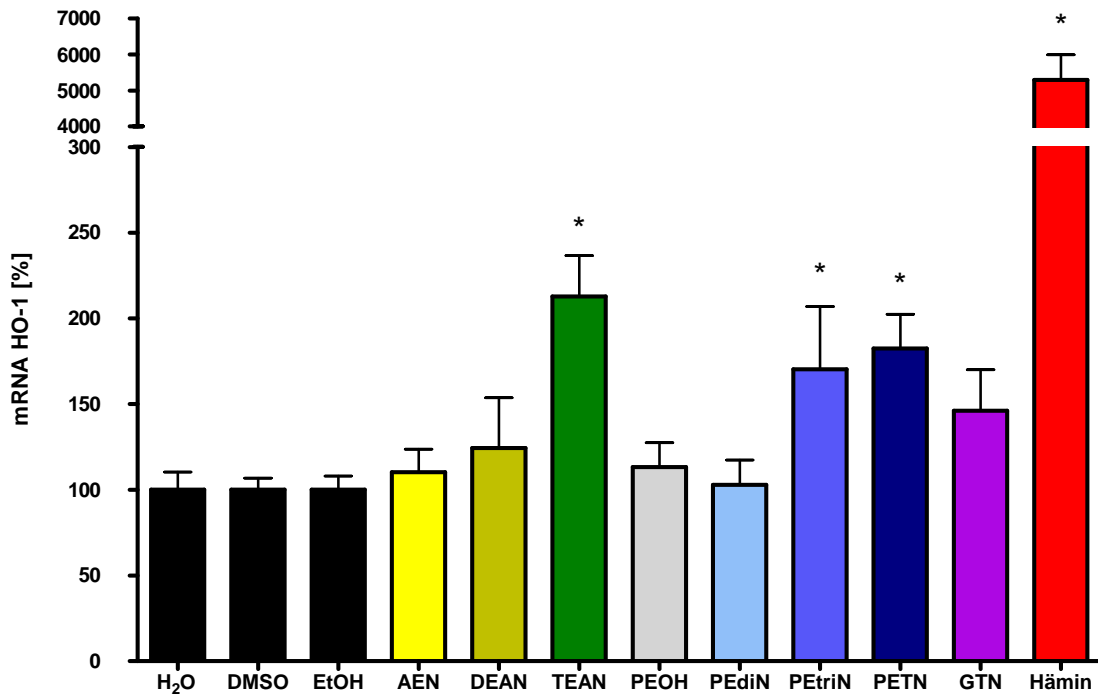


Abb. D-5: Effekt der organischen Nitrate [ $5 \cdot 10^{-5}$  M] auf die Expression der mRNA für HO-1 nach 6 h Inkubationszeit in EA.hy 926 Zellen. Mittelwerte  $\pm$  SEM in % bezogen auf die entsprechende Lösungsmittelkontrolle ( $n = 6-15$ ). \* zeigt  $P < 0,05$  im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle an.

Auch nach Inkubation der Zellen 24 h mit PETN und TEAN war die Expression der HO-1-mRNA signifikant erhöht. Überraschend war jedoch, dass die nach 6 h gemessene Induktion der mRNA-Expression durch PETriN nach der längeren Inkubationszeit nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Für AEN, DEAN, PEDiN und PEOH wurde weiterhin keine erhöhte Expression gezeigt (Abb. D-6). Aufgrund zu geringer Versuchsanzahl konnten für GTN nach 24 h noch keine zuverlässigen Werte ermittelt werden.

Nachdem man herausgefunden hatte, dass PETN auf genomischer Ebene die Bildung antioxidativ wirkender Substanzen induziert, vermutete man darin einen Grund dafür, dass sich auch bei kontinuierlicher Gabe von PETN keine Toleranz entwickelt. Infolgedessen sollte sich auch bei anderen organischen Nitraten, die keine Toleranz zeigen, eine Induktion der HO-1-Expression nachweisen lassen. AEN, ein hochpotentes, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* toleranzfreies Nitrat, verursacht weder oxidativen Stress noch eine endotheliale Dysfunktion (Publikation 4). Die Vermutung lag nahe, dass AEN eine erhöhte Expressierung der HO-1 zur Folge haben könnte. Allerdings ließ sich in den Experimenten an humanen Endothelzellen keine Induktion des Enzyms nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte jedoch für das niedrig potente Trinitrat TEAN eine verstärkte Expression der HO-1 gezeigt werden. Dies ist insofern erstaunlich, da TEAN sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur Toleranzentwicklung führt und darüber hinaus auch oxidativen Stress und endotheliale

Dysfunktion induziert. Beide untersuchten Dinitrate, DEAN und PEdiN, zeigten keine HO-1-Induktion.

Geht man von einem Zusammenhang zwischen Toleranzentwicklung und HO-1-Expression aus, stimmt dieses Ergebnis bei DEAN mit dem Auftreten einer Tachyphylaxie überein. Der PETN-Metabolit PEdiN zeigt jedoch *in vitro* keine Toleranzentwicklung und passt somit wie auch schon AEN und TEAN nicht in diese Theorie. Die Stimulation der HO-1-Expression scheint nicht in direktem Zusammenhang mit der Entstehung einer Nitrattoleranz zu stehen. Nicht jedes organische Nitrat, das weder Toleranz noch oxidativen Stress induziert, führt auch gleichzeitig zur verstärkten HO-1-Exprimierung. Im Gegensatz dazu kann auch ein Nitrat, nach dessen Gabe sich sowohl Toleranz als auch oxidativer Stress entwickelt, ein HO-1-Induktor sein. Eine Abhängigkeit der HO-1-Stimulation von der Wirkstärke oder der Anzahl der Nitratgruppen kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da sonst auch eine Behandlung mit GTN in einer verstärkten Expression der HO-1 resultieren müsste.

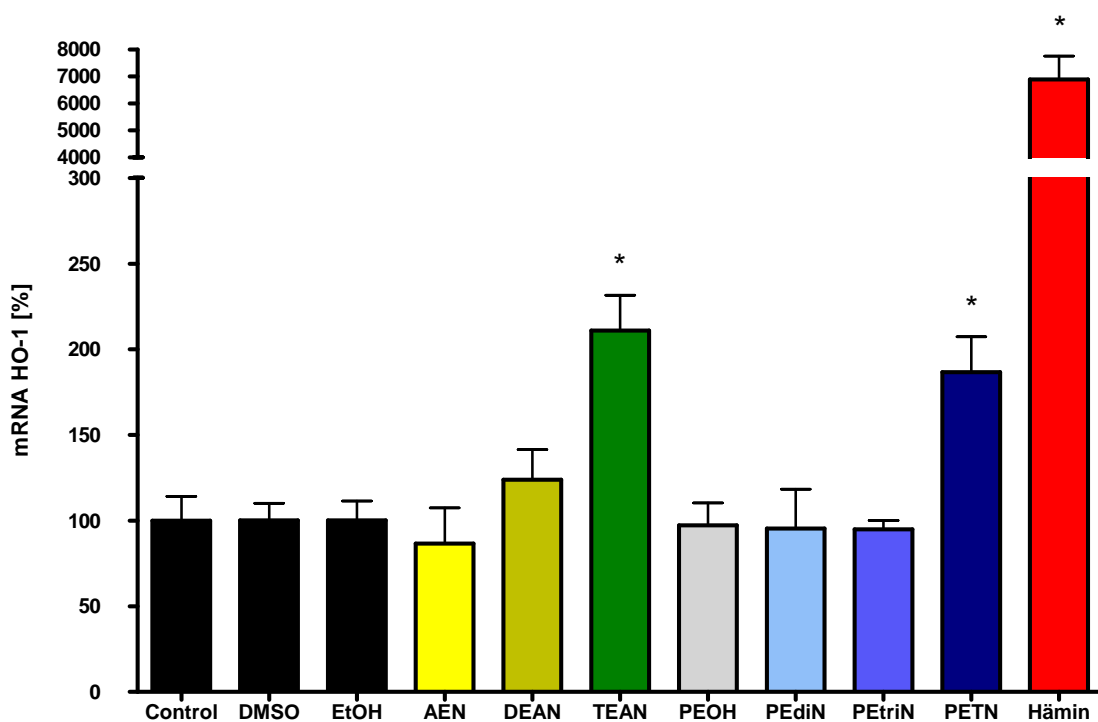


Abb. D-6: Effekt der organischen Nitrate [ $5 \cdot 10^{-5}$  M] auf die Expression der mRNA für HO-1 nach 24 h Inkubationszeit in EA.hy 926 Zellen. Mittelwerte  $\pm$  SEM in % bezogen auf die entsprechende Lösungsmittelkontrolle ( $n = 5-9$ ). \* zeigt  $P < 0,05$  im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle an.

#### D.4 Untersuchungen zur Bioaktivierung von Aminoalkylnitraten

Bisher werden in der Literatur zwei Bioaktivierungswege für organische Nitrate postuliert. Die hoch wirksamen organischen Nitrate GTN und PETN sowie der hochpotente aktive PETN-

Metabolit PEtriN werden demnach über die mitochondriale ALDH-2 zu einer bisher nicht eindeutig identifizierten Stickstoff-Spezies aktiviert. Die niedrigpotenten organischen Nitrate ISMN und ISDN sowie die schwach vasoaktiven Metaboliten GDN, GMN, PEdiN und PEmonoN werden unabhängig von der ALDH-2, vermutlich über CYP450-Enzyme metabolisiert. Man geht davon aus, dass die Art der Bioaktivierung von der Aktivität des entsprechenden Nitrats abhängt bzw. dass, wenn ein Nitrat hochpotent ist, es über die ALDH-2 bioaktiviert wird. Diese Überlegungen wurden erstmals in Frage gestellt, als mit Aminoethylnitrat ein hoch aktives, toleranzfreies Nitrat identifiziert wurde, das nicht über die ALDH-2 metabolisiert wird. Gleichzeitig wurde Triethylaminotrinitrat als ein schwach wirksames Nitrat charakterisiert, das sowohl Toleranz entwickelt, als auch über die ALDH-2 verstoffwechselt wird (*Publikation 4*). Um zu prüfen, wie die weiteren Aminoalkylnitrate bioaktiviert werden, wurden mit Hilfe der Organbadmethode *in vitro* Untersuchungen mit 6 Verbindungen durchgeführt (*Abb. D-7*). Die Gefäße wurden 30 min vor Aufzeichnung der kumulativen Konzentrations-Wirkungskurve mit dem ALDH-Inhibitor Benomyl [ $10^{-5}$  M] vorinkubiert. Eine Rechtsverschiebung der Kurve im Vergleich zur Kontrolle zeigt eine Beteiligung der ALDH in der Bioaktivierung an.

### **Ergebnisse**

Bei den Studien zur Bioaktivierung der organischen Aminoalkylnitrate zeigt sich, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Wirkstärke der Verbindungen und dem Stoffwechselweg des entsprechenden Nitrats gibt. Eine hohe Wirksamkeit an den Gefäßen geht nicht automatisch mit einer Aktivierung über die ALDH einher und umgekehrt.

Sowohl für das Aminoethylnitrat (AEN, **1**) als auch für dessen N-dimethyliertes Derivat (**2**) kam es nach Vorbehandlung der Gefäße mit Benomyl zu einer signifikanten Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve (*Abb. D-7A*). Eine Beteiligung der ALDH-2 in der Bioaktivierung der Mononitrate lässt sich demnach ausschließen. Während die Antwort der Gefäße auf das 1,2-GDN-Analoge (**3**) nicht durch den ALDH-Inhibitor beeinträchtigt war, kam es jedoch nach Benomyl-Inkubation zu einer abgeschwächten Wirkung des Diethylaminodinitrats (DEAN, **4**) (*Abb. D-7B*). Im Gegensatz zur bisherigen Annahme wird also bei den Aminoalkyldinitraten nicht das stärker wirksame Nitrat, sondern die weniger potente Substanz durch die ALDH bioaktiviert. Sowohl der trinitrierte TRIS-Puffer (**5**) als auch Triethylaminotrinitrat (TEAN, **6**) zeigten nach vorhergehender Inkubation mit Benomyl eine signifikant verminderte Vasodilatation (*Abb. D-7C*). Es kann also davon ausgegangen werden, dass beide Aminoalkyltrinitrate durch ALDH-2 bioaktiviert werden. Alle Ergebnisse sind noch einmal in *Tab. D-6* zusammengefasst.

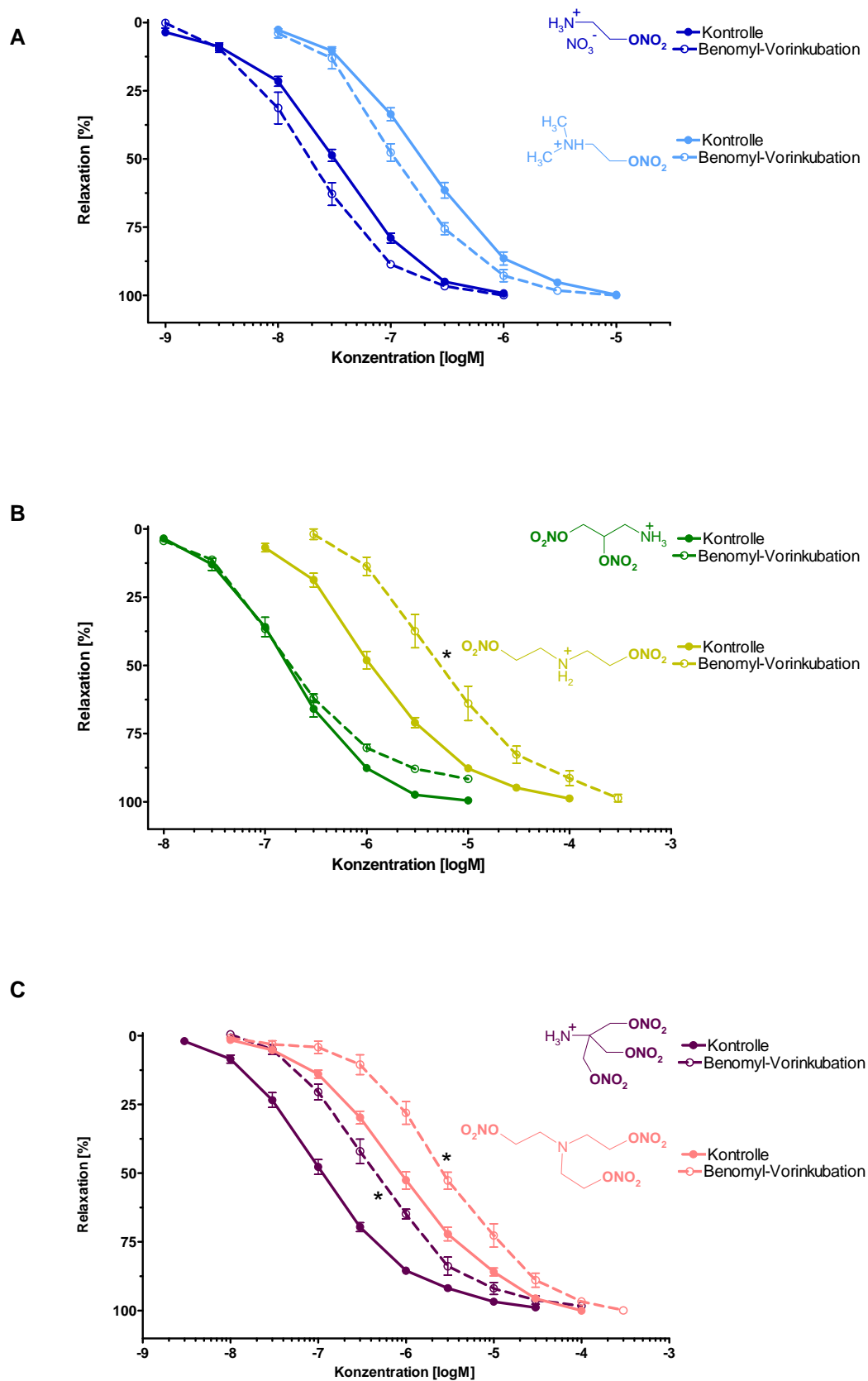
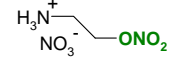
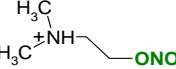
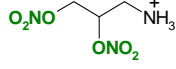
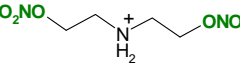
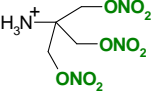
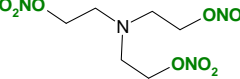


Abb. D-7: In vitro Untersuchungen zur Bioaktivierung von organischen Aminoalkylnitrat nach Vorinkubation mit dem ALDH-Inhibitor Benomyl [ $10^{-5}$  M] an isolierten Pulmonalarterien des Schweins. Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 5-10$ , \* zeigt  $P < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle an. **A:** Mononitrate; **B:** Dinitrate; **C:** Trinitrate.

Tab. D-6: Vergleich der  $EC_{50}$ -Werte für die Vasodilatation mit und ohne Vorinkubation von Benomyl an mit  $PGF_{2\alpha}$ -vokontrahierten, isolierten Arterien aus der Schweinelunge. Das Verhältnis von  $EC_{50}$  (Benomyl) zu  $EC_{50}$  (Kontrolle) gibt die x-fache Verminderung der vasodilatatorischen Wirkstärke an.

Substanz	Struktur	$EC_{50}$ [M] (Kontrolle)	$EC_{50}$ [M] (Benomyl)	$\frac{EC_{50} \text{ (Benomyl)}}{EC_{50} \text{ (Kontrolle)}}$
1		$3,02 \cdot 10^{-8}$	$1,92 \cdot 10^{-8}$	0,7
2		$1,92 \cdot 10^{-7}$	$1,16 \cdot 10^{-7}$	0,7
3		$1,73 \cdot 10^{-7}$	$2,02 \cdot 10^{-7}$	1,2
4		$1,19 \cdot 10^{-6}$	$5,67 \cdot 10^{-6}$	4,8
5		$1,14 \cdot 10^{-7}$	$4,77 \cdot 10^{-7}$	4,2
6		$9,08 \cdot 10^{-7}$	$2,90 \cdot 10^{-6}$	3,2

Nach bisherigen Ergebnissen zur Bioaktivierung organischer Nitrate ging man davon aus, dass hoch wirksame Nitrate über die ALDH-2 verstoffwechselt werden, während weniger aktive Verbindungen unabhängig von diesem Enzym aktiviert werden. Weiterhin wurde postuliert, dass ein Nitrat umso vasoaktiver ist, je mehr Nitratgruppen im Molekül enthalten sind. Da jedoch bei den Aminoalkylnitraten keine solche Beziehung zu existieren scheint, sind sie geeignet, weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Bioaktivierung zu erhalten. Obwohl die Mononitrate verhältnismäßig hohe Aktivitäten besitzen, zeigt keines der untersuchten Mononitrate nach Inhibition der ALDH-2 eine abgeschwächte vasodilatatorische Wirkung. Während bei den Dinitraten die Ergebnisse unterschiedlich sind, werden die organischen Nitrate mit drei Nitratgruppen von der ALDH-2 verstoffwechselt. Einen Zusammenhang zwischen der Wirkstärke der Verbindungen und ihrer Aktivierung gibt es hier offensichtlich nicht. Vielmehr lässt sich eine Abhängigkeit von der Anzahl der Nitratgruppen und der Metabolisierung erkennen. Unabhängig von ihrer Wirkstärke steigt mit der Anzahl der Nitratinheiten im Molekül die Wahrscheinlichkeit einer Bioaktivierung durch die ALDH-2.

## E Gesamtdiskussion

Organische Nitrate sind eine bedeutende und langbekannte Wirkstoffgruppe, von der sich 4 Vertreter, nämlich Pentaerythritoltetranitrat (PETN), Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN) und Isosorbidmononitrat (ISMN), in der Klinik etabliert haben. Diese Substanzen werden auffällig unterschiedlich und nicht im Einklang mit ihrer vasodilatatorischen Potenz dosiert (siehe *Tab. 1* in *Publikation 5*). In Studien an isolierten Gefäßen, also *in vitro*, wurde belegt, dass eine steigende Anzahl an Nitratgruppen zu einer gesteigerten Wirkung der Substanzen führt.<sup>130</sup> Auch in ALDH-2 knockout Mäusen konnte eine direkte Korrelation zwischen Nitratgruppenanzahl und Wirkstärke gezeigt werden.<sup>128</sup> Dennoch wird das Tetranitrat PETN höher dosiert als die anderen Mono-, Di- und Trinitrate.

### E.1 Beeinflussung der Vasoaktivität durch das Trägermolekül

Da das Wirkprinzip sowie der Bioaktivierungsweg der organischen Nitrate bis vor wenigen Jahren weitgehend unbekannt waren, ging man lange davon aus, dass die Lipophilie der Verbindungen einen entscheidenden Einfluss auf ihre Wirkung hat. Diese Hypothese ließ allerdings die Nitratgruppenanzahl völlig außen vor. Zudem wusste man bereits aus Studien mit isomeren, zweifach nitrierten Zuckeralkoholen, dass sie trotz gleicher Lipophilie durchaus unterschiedliche Aktivitäten besitzen. Um den Einfluss des Nitrat-tragenden Restes auf die Aktivität eines organischen Nitrats zu prüfen, wurden verschiedene Mononitrate untersucht (*Publikation 1*). Danach kann auch bei gleichbleibender Anzahl von Nitratfunktionen durch Veränderung des Trägermoleküls eine große Spanne unterschiedlicher Wirkaktivitäten auftreten. Die  $EC_{50}$ -Werte der Mononitrate reichen von  $10^{-8}$  M bis  $10^{-4}$  M, umfassen also knapp vier Zehnerpotenzen. Das 2-Aminoethylnitrat (AEN) ist trotz nur einer Nitratfunktion sogar äquipotent zu GTN. Entgegen der bisherigen Annahme, dass die Wirkung maßgeblich von der Lipophilie und der Anzahl der Nitratfunktionen abhängt, hat das Restmolekül also einen erheblichen Effekt auf die Vasoaktivität. Die Lipophilie hingegen scheint nicht in direktem Zusammenhang mit der Wirkstärke zu stehen, es wurde keine Steigerung der Potenz bei steigender Lipophilie – oder umgekehrt – beobachtet (siehe *Abb. 2* in *Publikation 1*). Die Vasoaktivität der sehr lipophilen Verbindung 14 ist sogar geringer als die des zur Lösungsvermittlung eingesetzten DMSO. Dies kann allerdings auch durch den sterisch hindernden, voluminösen Rest verursacht werden. Möglicherweise wird dadurch eine Interaktion mit dem bioaktivierenden Enzym erschwert. In Studien mit NO-Donor-Hybridverbindungen konnte dies ebenfalls beobachtet werden.<sup>140</sup> Es scheint, als hätte weniger die Polarität als vielmehr die Anwesenheit bestimmter reaktiver Substituenten, wie z. B. Brom oder eben eine Aminogruppe, Einfluss auf die Wirkungsstärke der organischen

Nitrate. Dies könnte in einer erhöhten Affinität gegenüber dem endogenen Target aufgrund von Wechselwirkungen des Substituenten, der sich in Nachbarschaft zur Nitratgruppe befindet, begründet sein.

## E.2 Vasorelaxierende Eigenschaften der GTN- und PETN-Metaboliten

Bisherige Untersuchungen weisen darauf hin, dass die aktiven Metaboliten der organischen Oligonitrate GTN und PETN zu deren klinisch-pharmakologischer Wirkung beitragen könnten.<sup>130;141</sup> Daher war es von Interesse, die PETN-Metaboliten PEtriN, PEdiN, PEmonoN sowie die GTN-Metaboliten 1,2-GDN, 1,3-GDN, 1-GMN und 2-GMN zu synthetisieren und auf ihre vasodilatatorischen Eigenschaften zu testen (*Publikation 3*). Die  $EC_{50}$ -Werte nahmen mit verminderter Anzahl der Nitratgruppen im Molekül zu (*siehe Tabelle 1, Publikation 3*), die Wirkung wurde also schwächer. Diese Befunde stimmen mit früher erhaltenen Ergebnissen überein, dass bei ähnlichen Molekülen eine steigende Anzahl von Nitratfunktionen zu einer gesteigerten Vasoaktivität führt. Die Metaboliten des PETN zeigen mit zunehmendem Abbau auch eine verschlechterte Vasodilatation. Mit der Einführung weiterer Nitratgruppen lässt sich die vasodilatatorische Potenz wieder erhöhen. Liegt zwischen PEdiN und PEtriN noch eine Aktivitätsverbesserung um das 72fache, wird durch die vierte Nitratfunktion beim Übergang von PEtriN zu PETN lediglich noch eine Verbesserung um den Faktor 4 erreicht. Mannitolhexanitrat (MHN) wirkt nur noch etwa doppelt so gut wie PETN ( $EC_{50} = 3,45 \cdot 10^{-9}$  M).

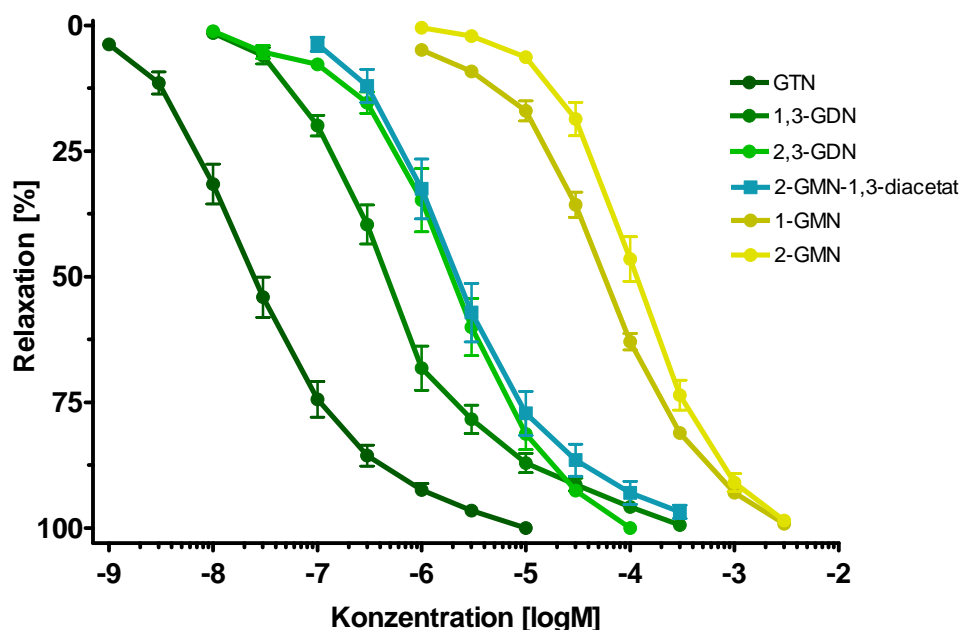


Abb. E-1: Konzentrations-Wirkungskurven von GTN, seinen bioaktiven Metaboliten und 2-GMN-1,3-diacetat an  $PGF_{2\alpha}$ -vokontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein. Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5-9 separaten Versuchen.



Bei den GTN-Metaboliten waren die Ergebnisse ähnlich (*Abb. E-1*). Überraschend waren jedoch die unterschiedlichen Wirkstärken der Strukturisomere 1,3-GDN und 1,2-GDN sowie 1-GMN und 2-GMN. Es wird deutlich, dass die organischen Nitrate mit endständigen Nitratgruppen (1,3-GDN; 1-GMN) besser wirksam sind als ihre jeweiligen korrespondierenden Verbindungen, die den Nitratrest am mittleren Kohlenstoff tragen (1,2-GDN, 2-GMN). Dies lässt sich wahrscheinlich mit einer gesteigerten Affinität gegenüber dem bioaktivierenden Enzym durch bessere sterische Erreichbarkeit des aktiven Zentrums erklären. Resultieren könnte daraus ein verlangsamter Abbau der Substanzen durch biotransformierende Enzyme. Dieser Effekt wurde bereits bei den organischen Mononitraten 5-ISMN und 2-ISMN beobachtet und hat einen bedeutenden Einfluss auf das Wirkprofil der Verbindungen (*Publikation 5*). Bereits bekannt ist sowohl bei GDN als auch bei GMN die höhere Hydrolysestabilität der Nitratfunktion an der C1-Position gegenüber der C2-Position, die im Fall der Nitratmetabolite auch zu den Wirkungsunterschieden beitragen könnte.<sup>142;143</sup>

Das Zwischenprodukt zur Synthese von 2-GMN, welches an den terminalen OH-Gruppen jeweils acetyliert ist (2-GMN-1,3-diacetat) war im Vergleich zu 2-GMN um etwa eine Zehnerpotenz stärker wirksam. Dieser potenzierende Effekt einer Esterfunktion wurde schon in *Publikation 1* bei 1-Nitrooxypropionsäuremethylester (Verbindung 4) beobachtet, der ebenfalls stärker wirksam war als die korrespondierende Carbonsäure. Denkbar wäre hier doch ein Einfluss der erhöhten Lipophilie der Carbonsäureester gegenüber der freien Säure.

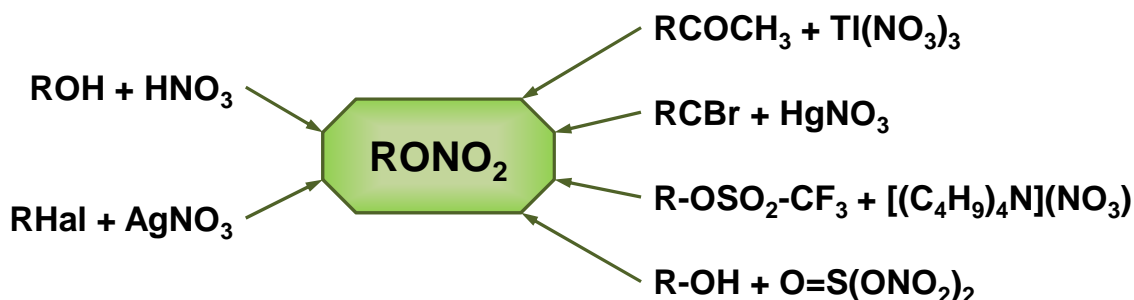
### E.3 Einfluss einer Aminogruppe im Trägermolekül auf die Vasoaktivität

In *Publikation 1* wird die Charakterisierung des 2-Aminoethylnitrats (AEN) als hoch wirksames Nitrat beschrieben. Zwar waren in der Literatur schon eine Reihe von Aminoalkylnitraten bekannt – mit Triethylaminotrinitrat (TEAN) befand sich sogar in der Vergangenheit bereits ein Vertreter dieser Substanzgruppe auf dem Markt – jedoch gab es bislang keine systematischen Studien der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Aminoalkylnitrate. In den hier durchgeführten Studien mit unterschiedlichen Aminoalkylnitraten konnte gezeigt werden, dass die Einführung einer Aminogruppe die vasoaktiven Eigenschaften von organischen Nitraten entscheidend im Hinblick auf Wirkstärke, Tachyphylaxie und Bioaktivierung moduliert.

#### E.3.1 Synthese einer Serie unterschiedlicher Aminoalkylnitrate

Nach Entdeckung der Salpetersäureester Mitte des 19. Jahrhunderts wurde eine Vielzahl von Methoden zur Herstellung neuer potentieller Sprengstoffe und Treibstoffe dokumentiert.

Im Laufe der Jahrzehnte haben sich unterschiedliche Wege zur Herstellung organischer Nitrats etabliert.<sup>144</sup> Eine Auswahl ist in *Abb. E-2* dargestellt.



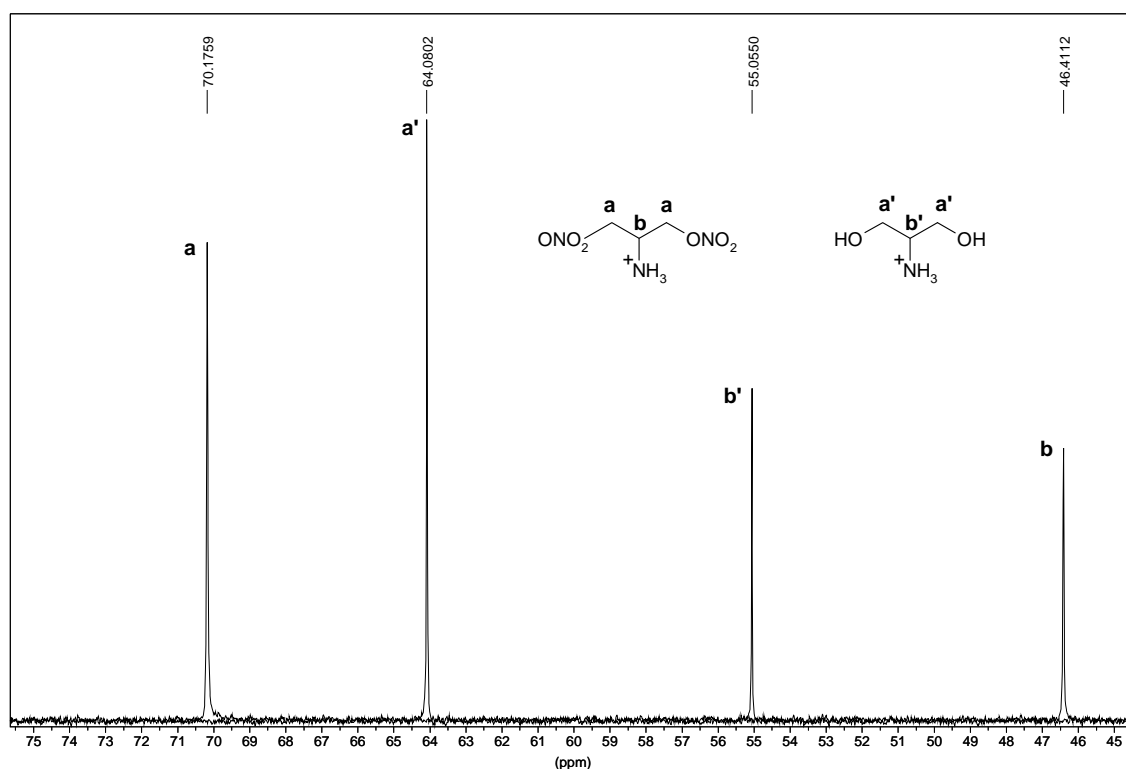
*Abb. E-2: Beispiele für einige literaturbekannte Synthesen<sup>144</sup>*

Einige dieser Herstellungsverfahren wurden speziell für problematische Synthesen entwickelt. Beispielsweise eignet sich die nukleophile Substitution einer Triflat (Trifluormethansulfonyloxy)-Gruppe durch die Nitrooxy-Gruppe in Tetrabutylammoniumnitrat verstärkt für die Nitrierung von Zuckern<sup>145</sup> während die Umsetzung mit Thionyldinitrat sogar eine Veresterung von Phenolen ermöglicht.<sup>146</sup> Für die Synthese von Alkylnitraten haben sich besonders die Umsetzung von Alkylhalogeniden mit Silbernitrat sowie die Veresterung von Alkoholen mit Salpetersäure bewährt. Als Alkylhalogenid wird zumeist das Bromid verwendet, bekannt ist die Reaktion allerdings auch für Alkyljodide und reaktive Alkylchloride. Die Umsetzung findet in Acetonitril statt, der Reaktionsverlauf kann so anhand des ausfallenden Silberhalogenids überwacht werden. Zur Darstellung der Aminoalkylnitrats wurde in dieser Arbeit hauptsächlich die Umsetzung von mit Aminoalkoholen mit hochkonzentrierter Salpetersäure durchgeführt. Diese Reaktion wurde schon früh für verschiedene Aminoalkohole beschrieben.<sup>147</sup> Als problematisch erweist sich bei der direkten Umsetzung der Substanzen allerdings, dass die Produkte explosionsgefährlich sind. Eine Durchführung in Dichlormethan erwies sich als zweckmäßig, weil dadurch die Gefahr einer spontanen Zersetzung reduziert wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich die entstehenden Ammoniumsalze der Salpetersäureester schlecht darin lösen, so dass sie leicht durch Filtration abgetrennt werden können und nur noch umkristallisiert werden müssen.<sup>148</sup> Aufgrund dieser simplen Aufreinigung lassen sich die Verbindungen mit Ausbeuten von 80-90 % isolieren.

Leider lässt sich der Reaktionsverlauf der Nitrierung von Aminoalkoholen nur schwer verfolgen, da die Aminoalkylnitrats keine verwertbare UV-Eigenabsorption aufweisen. Sie fallen außerdem während der Reaktion als Salze aus. Auch eine Detektion mittels GC/MS kommt nicht in Frage, da sich organische Nitrats bei erhöhter Temperatur leicht zersetzen. Die Analytik bestand deshalb aus NMR-Spektroskopie, Elementaranalyse, IR-Spektroskopie

und Schmelzpunktbestimmung der kristallinen Salze durchgeführt. Zur Strukturaufklärung und Reinheitsbestimmung der Aminoalkylnitrate wurden schließlich NMR-Spektroskopie und Elementaranalyse herangezogen.

Aufgrund der geringen Anzahl von Signalen der synthetisierten Aminoalkylnitrate lassen sich die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren gut auswerten. Leicht zu erkennen ist im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum stets die Tieffeldverschiebung des neben der Nitratfunktion lokalisierten Kohlenstoffs im Vergleich zum korrespondierenden Alkohol. Im Gegensatz dazu erscheint das Signal des Amin-substituierten Kohlenstoffs nach der Nitrierung hochfeldverschoben. Exemplarisch ist dies für 1,3-Bis(nitrooxy)propan-2-ammoniumnitrat und das entsprechende Edukt in *Abb. E-3* dargestellt.



*Abb. E-3: Ausschnitt aus den überlagerten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von 1,3-Bis(nitrooxy)propan-2-ammoniumnitrat (links) und seiner Synthesevorstufe, 2-Amino-1,3-propandiol (rechts), in  $\text{DMSO-d}_6$ .*

Obwohl die Substanzen grundsätzlich schon aus chemischen Arbeiten bekannt sind – die Literatur zu Synthese und analytischen Daten der Substanzen ist in *Veröffentlichung 6* zitiert – wurden sie bisher größtenteils nicht in pharmakologischen *in vitro* Experimenten untersucht.

### E.3.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen der organischen Aminoalkylnitrate

#### ***Vasodilatatorische Wirkung***

Schon in *Publikation 1* wurde gezeigt, dass das Nitrat-tragende Restmolekül einen wichtigen Einfluss auf die Wirkaktivität der organischen Nitrate besitzt. Diese Hypothese wurde mit der Untersuchung der Aminoalkylnitrate untermauert. Weiterhin wurden für zwei ausgewählte Nitrate (AEN und TEAN) Daten zur Pharmakologie, Toleranzentwicklung sowie zur Bioaktivierung ermittelt (*Publikation 4*). Es wurde festgestellt, dass die Wirkungsstärke der Aminoalkylnitrate nicht allein auf die Anzahl der Nitratgruppen zurückzuführen ist. Bestätigt wurde dies anhand 15 untersuchter organischer Aminoalkylnitrate (*Publikation 6*). In der Gruppe der untersuchten Aminoalkylmononitrate ergab sich wie schon für die Alkylmononitrate ein breites Spektrum unterschiedlicher Wirkstärken. Die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte umfassten annähernd drei Zehnerpotenzen und auch bei den Oligonitraten lag die Differenz bei zwei Zehnerpotenzen (siehe *Publikation 6, Tabelle 1*). Durch Methylierung wurde die Aktivität im Vergleich zur Basisverbindung AEN generell herabgesetzt, wie sowohl für N-methylierte (5, 12) als auch für C-methylierte Verbindungen (9, 10) gilt. Allerdings hatte die Dimethylierung am terminalen Stickstoff in Verbindung 5 einen geringeren Einfluss auf die Aktivität als eine N-Monomethylierung in Verbindung 12. Eine endständige primäre Amin- oder Ammoniumfunktion scheint für eine hohe Potenz essentiell zu sein, die Verlängerung der Ethylenkette hingegen resultiert in einer deutlichen Wirkungsverminderung (Verbindung 13). Einbettung in ein starres Ringsystem wie in Verbindung 15 ist ebenfalls mit einer Abnahme der Vasoaktivität verbunden.

#### ***Entwicklung einer in vitro Toleranz***

Wie auch das Ausmaß der Gefäßrelaxation, so folgt die Entstehung einer *in vitro* Toleranz bei den Aminoalkylnitraten keinen strikten Regeln. Die bisherige Annahme, dass hochpotente Substanzen immer die Entstehung einer Tachyphylaxie induzieren und schwach wirksame Nitrate generell wenig zur Toleranzbildung neigen, wurde schon in *Publikation 4* in Frage gestellt. Das hoch wirksame AEN wurde als *in vitro* toleranzfrei charakterisiert, während das schwach wirksame TEAN bei wiederholter Gabe zu einer deutlichen Abschwächung der vasodilatatorischen Potenz führt. Die detaillierten Untersuchungen der Aminoalkylnitrate in *Publikation 6* bestätigen diese ersten Befunde. Im Gegensatz zu den therapeutisch verwendeten Alkylnitraten existiert hier keine direkte Korrelation zwischen der vasorelaxierenden Potenz und der Ausbildung einer *in vitro* Toleranz. Auch die Anzahl der Nitratfunktionen im Molekül scheint *in vitro* keine entscheidende Rolle bei der Toleranzentwicklung zu spielen. Sowohl bei den Aminoalkylmono- als auch bei den Aminoalkyldinitraten gibt es unabhängig von der

Vasoaktivität sowohl toleranzfreie als auch Toleranz induzierende Verbindungen. Überraschend ist die Tatsache, dass es bevorzugt bei den schwächer wirksamen Aminoalkylnitratem zur Ausbildung eines Toleranzphänomens kommt (siehe Publikation 6, Abb. 2-4). Sogar von zwei Konstitutionsisomeren, die jeweils an einem der benachbarten Kohlenstoffe des AEN methyliert sind und nahezu die gleiche vasoaktive Potenz besitzen, zeigte nur eines bei wiederholter Gabe eine Tachyphylaxie. Ebenfalls führt bei beiden Trinitratem eine nochmalige Applikation zur Entwicklung einer Tachyphylaxie.

### **Bioaktivierungsmechanismus**

Nach den Befunden aus Publikation 4 wurde die Hypothese aufgestellt, dass vasodilatatorische Potenz, *in vitro* und *in vivo* Toleranz sowie die zugrunde liegende Bioaktivierung in engem Zusammenhang stehen. Ging man früher davon aus, dass nur hochpotente Nitrate eine *in vitro* Toleranz entwickeln, so wurde aufgrund der nun vorliegenden Daten eher spekuliert, dass die Aktivierung über die mitochondriale ALDH eine entscheidende Rolle in der Toleranzentwicklung spielt. Es lag daher nahe, mit den Aminoalkylnitratem experimentelle Untersuchungen zur Bioaktivierung durchzuführen. In diesen orientierenden Versuchen wurde keine Abhängigkeit des Bioaktivierungsweges von der Wirkstärke der Nitrate festgestellt. Im Gegenteil, in den Experimenten führte bei den zwei untersuchten Dinitratem die Vorinkubation mit dem ALDH-Inhibitor Benomyl nur bei der schwächer wirksamen Verbindung zu einer verminderten Vasoaktivität. Wie schon bei der *in vitro* Toleranz weisen die Ergebnisse vielmehr auf eine Beziehung zwischen der Anzahl der Nitratgruppen und der Metabolisierung hin. Beide Mononitrate werden unabhängig von der ALDH-2 verstoffwechselt während beide Trinitrate den Bioaktivierungsweg über die Aldehyddehydrogenase nutzen. Bei den Dinitratem sind die Ergebnisse uneinheitlich, hier scheinen weitere Faktoren eine Rolle zu spielen, die noch nicht bekannt sind. Es ist jedoch festzustellen, dass alle Aminoalkylnitrate, die über die ALDH-2 bioaktiviert werden, ebenfalls eine *in vitro* Toleranz hervorrufen. Mit größerer Wahrscheinlichkeit ist also die *in vitro* Toleranzentwicklung von der Anzahl der Nitratgruppen und dem endogenen Aktivierungsmechanismus als von der Wirkstärke abhängig.

## **E.4 Organische Aminoalkylnitrate - Eine neue Klasse von NO-Donoren**

Organische Aminoalkylnitrate unterscheiden sich in ihren Struktur-Wirkungsbeziehungen deutlich von den therapeutisch verwendeten organischen Alkylnitratem. Sie folgen keinen bisher postulierten Gesetzmäßigkeiten zur vasodilatatorischen Potenz und auch Toleranzentwicklung und Bioaktivierung scheinen eigenen Regeln zu unterliegen.

In Studien zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen von 15 strukturell unterschiedlichen Aminoalkylnitraten konnte keine der getesteten Substanzen an die Wirkstärke des AEN, einem Mononitrat, heranreichen. Zwar wurde bereits 1947 eine pharmakologische Arbeit über organische Aminoalkylnitrate vorgelegt, in der sich AEN ebenfalls als stark vasodilatatorisch wirksame Substanz herausstellte, es handelt sich dabei allerdings nicht um vergleichende *in vitro* Experimente, sondern um *in vivo* Studien an Hunden.<sup>149</sup> Die verschiedenen Aminoalkylnitrate wurden narkotisierten Tieren intravenös verabreicht. Ähnlich wie bei den in dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden *in vitro* Experimenten konnten weder N- bzw. C-alkylierte Substanzen noch TEAN die Wirkung von AEN übertreffen. Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache wird allerdings nicht geliefert.

Die strukturelle Ähnlichkeit von Aminoethylnitrat mit einigen biogenen Aminen kann als Ursache für dessen hohe Aktivität in Betracht gezogen werden. Beispielsweise enthalten die Aminosäure Serin, Cholin oder auch Noradrenalin die Teilstruktur des Eduktes von AEN, 2-Aminoethanol. Dieses entsteht endogen durch Decarboxylierung des Serins und ist unter anderem Bestandteil von Phospholipiden in der Zellmembran. Die Nutzung eines spezifischen Transporters für biogene Amine ist auch eine mögliche Grundlage zur Erklärung des guten Wirkprofils von AEN.

Wie die eingehenden Untersuchungen in *Publikation 4* und *Publikation 6* zeigen, verbindet AEN typische Eigenschaften einer hochpotenten Verbindung mit charakteristischen Eigenschaften eines organischen Mononitrats. Dem steht das organische Trinitrat TEAN gegenüber, dessen Effekte sich deutlich von denen des AEN unterscheiden. In Kooperation mit der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz (Arbeitskreise Prof. Daiber und Prof. Kleinert) wurden beide Substanzen auf ihre vasodilatatorische Wirkstärke getestet sowie weitere Untersuchungen zur Toleranz, Bioaktivierung, Entstehung oxidativen Stresses und Genexpression durchgeführt.

Bei *in vitro* Toleranzuntersuchungen verursacht AEN lediglich eine minimale, nicht signifikante Tachyphylaxie. TEAN hingegen bewirkt eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve. Die weiteren getesteten Aminoalkylnitrate in *Publikation 6* konnten keine strikten Regeln zur Entstehung einer Tachyphylaxie offenlegen. Im Gegensatz zu den reinen Alkylnitraten kommt es eher bei schwach wirksamen Aminoalkylnitraten *in vitro* zu einer Toleranzentwicklung.

Die Entwicklung einer Toleranz wird häufig mit der Entstehung von oxidativem Stress in Verbindung gebracht. Die Freisetzung von NO/NO<sub>x</sub> aus den organischen Nitraten führt in Kombination mit der erhöhten Superoxid-Bildung zu einer vermehrten Entstehung von Peroxinitrit (*siehe Abschnitt A.3.4*). Peroxinitrit wiederum ist an einer Reihe nachgeschalteter

Reaktionen beteiligt, die zu einer Abschwächung der Nitratwirkung beitragen. Daher wurde für AEN und TEAN in *Publikation 4* exemplarisch auch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Protein-Tyrosin-Nitrierung als Maß für den oxidativen Stress untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass AEN-Gabe weder zu einer Erhöhung der mitochondrialen ROS führt noch eine signifikant gesteigerte Protein-Nitrierung zur Folge hat. TEAN hingegen verursacht sowohl ROS als auch Protein-Nitrierung. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen der Toleranzuntersuchungen überein. Die Entstehung von Toleranz, nicht jedoch die Potenz eines organischen Nitrats scheint mit der Induktion von oxidativem Stress verknüpft zu sein. Das toleranzfreie Profil des AEN ist möglicherweise in seiner Fähigkeit begründet, keinen oxidativen Stress zu verursachen

Besonders für die Toleranzfreiheit des PETN wurde in den letzten Jahren das antioxidativ wirksame System um die Hämoxxygenase-1 verantwortlich gemacht.<sup>150</sup> Die drei organischen Aminoalkylnitrate AEN, DEAN und TEAN wurden daher vergleichend auf ihre Fähigkeit, die HO-1 zu induzieren, untersucht. Aufgrund der *in vitro* Toleranzentwicklungen und der Entstehung oxidativen Stresses war zu erwarten, dass AEN die HO-1-Expression induziert, DEAN und TEAN hingegen nicht. Überraschenderweise war dies nicht der Fall, da nur TEAN zu einer signifikant gesteigerten Expression der HO-1 führt. Obwohl TEAN Tachyphylaxie induziert und oxidativen Stress verursacht, setzt es im Gegensatz zu AEN eine antioxidative Signalkaskade in Gang. DEAN wiederum beeinflusste die Expression der HO-1 nicht, führt aber *in vitro* ebenfalls, wenn auch nicht in gleichem Maße, zur Toleranz. Nach den Ergebnissen der Untersuchungen zur Genexpression der organischen Aminoalkylnitrate bleibt fraglich, ob es hier einen Zusammenhang zur Toleranzentstehung gibt.

Die *in vitro* Versuche an Gefäßen von ALDH-2-defizienten Mäusen zeigen, dass das stärker wirksame AEN unabhängig von der ALDH-2 verstoffwechselt wird, während TEAN den Bioaktivierungsweg über die Aldehyddehydrogenase nutzt. Trotz ähnlich guter Wirkung wird AEN also anders bioaktiviert als GTN. Damit kann nicht mehr von einem Stoffwechselweg für hochpotente und einem anderen für niedrigpotente Substanzen gesprochen werden. Eine genauere Untersuchung der Bioaktivierung von AEN mit Hilfe von verschiedenen Inhibitoren ergab, dass AEN vermutlich auch nicht, wie für andere Mononitrate ermittelt, über die P450-Enzyme aktiviert wird. Vielmehr ergab sich nach Vorinkubation mit Allopurinol, einem Inhibitor der Xanthinoxidoreduktase, eine signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve. Anscheinend ist also neben ALDH-2 und CYP450 mit der Xanthinoxidoreduktase ein weiteres, drittes Enzym an der Bioaktivierung der organischen Nitrate beteiligt. Die Unterschiede in der Bioaktivierung konnten in weiterführenden Organbadstudien mit Aminoalkylnitraten und dem ALDH-Inhibitor Benomyl bestätigt werden.

Eine Korrelation zwischen der Anzahl der Nitratgruppen und Stoffwechselweg deutet sich an, aber es werden weitere Untersuchungen nötig sein, um diese Ergebnisse zu bestätigen.

Bei *in vivo* Toleranzuntersuchungen ergab sich jedoch ein anderes Bild der Aminoalkylnitrate. TEAN zeigte erwartungsgemäß Kreuztoleranzen gegenüber ACh und GTN (*Publikation 4*). Zudem kam es auch *in vivo* nach wiederholter Verabreichung von TEAN zur Toleranzentwicklung. Zwar kam es nach Vorbehandlung der Mäuse mit AEN nicht zu einer Kreuztoleranz mit Acetylcholin und GTN, aber interessanterweise induzierte die Substanz eine signifikante Toleranz gegenüber sich selbst. Auch bei PETN unterscheidet sich das Toleranzprofil *in vitro* von dem *in vivo*. Hier entwickelt sich in Studien an isolierten Organen eine Toleranz, nicht jedoch bei der therapeutischen Verwendung des PETN. Bislang gibt es zwei mögliche Theorien zur Erklärung dieses Phänomens. Erstens könnte die schlechte Bioverfügbarkeit der Substanz eine Rolle spielen, so dass nach der Einnahme nur die weniger aktiven und toleranzfreien Metaboliten PEdiN und PEmonoN für die Wirkung verantwortlich sind. Zweitens wird eine Beteiligung der bereits erwähnten Induktion des Hämoxygenase-Systems am Wirkprofil diskutiert. Eine denkbare Erklärung für das Toleranzprofil von AEN wäre beispielsweise eine Inaktivierung des bisher noch nicht bekannten Bioaktivierungsweges, die in *in vitro* Experimenten nicht zum Tragen kommt. Zum Vergleich sind die Eigenschaften der Aminoalkylnitrate AEN und TEAN denen von GTN und PETN in *Tab. E-1* gegenübergestellt.

*Tab. E-1: Übersicht über die pharmakologischen Eigenschaften der drei Aminoalkylnitrate AEN und TEAN im Vergleich zu den therapeutisch verwendeten organischen Nitraten GTN und PETN. n.b. = nicht bestimmt*

	AEN	TEAN	GTN	PETN
Anzahl ONO <sub>2</sub> -Gruppen	1	3	3	4
Vasodilatation	+++	+	+++	+++
Bioaktivierung über ALDH-2	-	+	+	+
<i>in vitro</i> Toleranz	-	+	+	+
<i>in vivo</i> Toleranz	+	+	+	-
Induktion von oxidativem Stress	-	+	+	-
Expression der HO-1	-	++	-	++



Abschließend bleibt festzuhalten, dass organische Alkylnitrate (wie GTN und PETN) im Allgemeinen und organische Aminoalkylnitrate (wie AEN und TEAN) im Speziellen eine heterogene Substanzklasse sind. Die Verbindungen stellen bisherige Zusammenhänge hinsichtlich Pharmakodynamik, Toleranz und Bioaktivierung in Frage. Es scheint bei den Aminoalkylnitraten keine klaren Regeln für ihre vasodilatierenden Eigenschaften zu geben. Vielmehr lässt sich ableiten, dass die vasodilatatorische Potenz nicht von der Anzahl der Nitratgruppen abhängt. Andererseits stellt sich heraus, dass sowohl *in vitro* Toleranz als auch Bioaktivierung von der Anzahl der Nitratgruppen beeinflusst werden. Insofern stellen Aminoalkylnitrate eine neue, pharmakologisch interessante Substanzklasse dar.

## E.5 Vasoaktivität von Nitrat-Hybridverbindungen

In den vergangenen Jahren hat gerade auf dem Gebiet der Alzheimer-Therapie die Entwicklung von Nitrat-Hybridverbindungen stark zugenommen. Generell werden Hybridverbindungen, die aus zwei bioaktiven Untereinheiten zusammengesetzt sind, aus den folgenden Gründen synthetisiert:

- ▶ Untereinheit 1 verbessert die Interaktion von Untereinheit 2 mit der Zielstruktur
- ▶ Untereinheit 1 und 2 interagieren gleichzeitig mit verschiedenen Bindungsstellen der Zielstruktur
- ▶ Beide Untereinheiten reagieren zur Steigerung des klinischen Effektes mit unterschiedlichen Zielstrukturen
- ▶ Untereinheit 1 kompensiert nachteilige Nebenwirkungen von Untereinheit 2

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden bereits vielfach verschiedene NO-Donor-Hybridverbindungen synthetisiert und hinsichtlich ihrer pharmakologischen Effekte untersucht. Als Beispiele seien genannt:

- ▶ Tacrin-Nitrat-Hybride als potentielle Anti-Alzheimer-Medikamente (*Publikation 2*)
- ▶  $\beta$ -Blocker-Nitrat-Hybride zur Behandlung kardialer Erkrankungen<sup>151</sup>
- ▶ NO-Donor-NSAID-Hybridverbindungen als nebenwirkungsreduzierte NSAIDs bzw. Antidementiva<sup>152</sup>
- ▶ Statin-Nitrat-Hybride als potentielle Therapeutika der Alzheimerschen Krankheit (*Abschnitt D.2*)
- ▶ NO-Donor-Ketoconazol-Hybridverbindungen als modifizierte Antimykotika<sup>153</sup>

Die in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Vasoaktivität untersuchten Hybridverbindungen wurden als verbesserte Arzneimittel zur Therapie der Alzheimerschen Krankheit entwickelt. Auch wenn hierbei die Vasoaktivität der Substanzen nicht im Vordergrund stand, so kann NO

neben seinen enzymmodulierenden, antioxidativen und neuroprotektiven Eigenschaften auch über eine erhöhte Vasodilatation in der Behandlung der AD von Vorteil sein.

Alle getesteten Hybridverbindungen lösten eine Vasodilatation aus, die außer beim NONOat-Hybrid bei höheren Konzentrationen auch vollständig war. Trotz Hybridisierung wird also die Einzelwirkung des Nitrats aufrechterhalten. Die drei untersuchten Tacrin-Nitrat-Hybridverbindungen waren allesamt moderate Vasodilatoren, deren Potenz im Bereich der einzelnen Mononitrate liegt. Das NONOat-Hybrid zeigte eine verhältnismäßig schwache Potenz. In dieser Verbindung ist die NONOat-Gruppe allerdings auch durch die Verknüpfung an das Tacrinmolekül wie ein Prodrug geschützt. Infolgedessen kommt es unter den *in vitro* Bedingungen des Organbads zu einer verzögerten Freisetzung von NO. Bei den Statin-Nitrat-Hybridverbindungen zeigte sich erneut die Abhängigkeit der vasodilatatorischen Potenz von der Anzahl der Nitratgruppen. Das getestete Dinitrat war aus der Statin-Hybrid-Gruppe die potenteste Substanz. Die beiden Mononitratverbindungen lagen im Aktivitätsbereich der Nitratopivalinsäure, wobei das lipophilere Lovastatin-Derivat sogar noch etwas besser als die eingesetzte Einzelnitratkomponente wirkte.

In den meisten Fällen wird bei der Synthese von Hybridverbindungen eine Mononitratfunktion in das Molekül eingeführt. Die Verknüpfung erfolgt meist über eine Ester- oder Amidbindung, aber auch die Alkylierung eines Amins wie bei den Verbindungen 5-10 in *Publikation 2* ist möglich. Das Kriterium zur Auswahl der Nitratkomponente war daher hauptsächlich die Reaktivität im Hinblick auf die nachfolgende Synthese des Hybridmoleküls, da man davon ausging, dass alle Mononitrate sowieso ähnlich gut wirksam sind. In *Publikation 1* und *Publikation 6* zeigten sich allerdings deutlich die Unterschiede in der Aktivität verschiedener Mononitrate. Es muss also in Betracht gezogen werden, dass auch die Wahl des Nitratrestes eine entscheidende Rolle spielt. Außerdem kann die vasodilatatorische Potenz durch die Einführung weiterer Nitratgruppen noch gesteigert werden.

## F Zusammenfassung

Mit dem Ziel, neue Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen organischer Nitrate zu gewinnen, wurden verschiedene organische Nitrate synthetisiert und im Hinblick auf Vasoaktivität, Toleranzentwicklung, Bioaktivierung und Genexpression untersucht.

Angelehnt an die wissenschaftlichen Problemstellungen in *Abschnitt B.2* seien nachfolgend die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefasst.

### ***Ermittlung der Struktur-Wirkungsbeziehungen organischer Alkylnitrate***

Bei der Untersuchung organischer Alkylmononitrate ergab sich ein breites Wirkspektrum der Verbindungen. Die Spanne reicht von einer nahezu unwirksamen Substanz (Verbindung 14) bis zum hochpotenten Aminoethylnitrat (AEN), das sogar an die Wirkpotenz von GTN heranreicht. Ein bisher oft beschriebener Zusammenhang zwischen der Lipophilie und Vasoaktivität wurde nicht gefunden. Eine naheliegende Erklärung für die deutlichen Differenzen in der vasodilatatorischen Wirkungsstärke sind unterschiedliche Affinitäten zu den bioaktivierenden Enzymen. Ebenso ist ein aktiver Transport für das einem biogenen Amin ähnelnde, hoch wirksame AEN denkbar. Es konnte gezeigt werden, dass die Vasoaktivität der organischen Nitrate keineswegs ausschließlich mit der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül korreliert. Dieser Zusammenhang besteht offensichtlich nur, wenn das Trägermolekül, wie bei den therapeutisch verwendeten Substanzen, keine weiteren funktionellen Gruppen enthält. Bei substituierten Verbindungen spielt der Nitrat-tragende Rest eine entscheidende Rolle für die Wirkpotenz (*Publikation 1*).

### ***Synthese neuartiger Aminoalkylnitrat-Verbindungen***

Um zu prüfen, welchen Einfluss die Einführung einer Aminogruppe in das Molekül auf die vasodilatatorische Potenz hat, wurden 15 strukturell verschiedene Aminoalkylnitrate synthetisiert. Die organischen Nitratverbindungen wurden durch Veresterung der entsprechenden Alkohole mit konzentrierter Salpetersäure in unterschiedlichen Lösungsmitteln dargestellt (*Publikation 6*).

### ***Struktur-Wirkungsbeziehungen der organischen Aminoalkylnitrate***

Durch *in vitro* Organbaduntersuchungen mit 15 strukturell verschiedenen Aminoalkylnitraten gelang es, zu zeigen, dass es sich bei diesen Verbindungen um eine neuartige Substanzklasse handelt. Weder die vasodilatatorische Potenz noch die *in vitro* Toleranz folgen den für die klinisch verwendeten organischen Nitrate ermittelten Regeln. Die getesteten Aminoalkylmono- und -oligonitrate weisen ähnlich den Alkylmononitraten aus *Publikation 1* eine große Breite hinsichtlich ihrer Wirkstärken auf (*Abb. F-1*). Es handelt sich

also bei den Aminoalkylnitraten nicht generell um stark wirksame Substanzen. Wiederum übertrifft keine der untersuchten Verbindungen die Aktivität des hochpotenten AEN. Dieses Ergebnis ist überraschend, da ja neben Mononitraten auch Aminoalkyldi- und -trinitrate auf ihre Vasoaktivität überprüft wurden. Die vasodilatatorische Potenz ist also nicht allein von der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül abhängig.

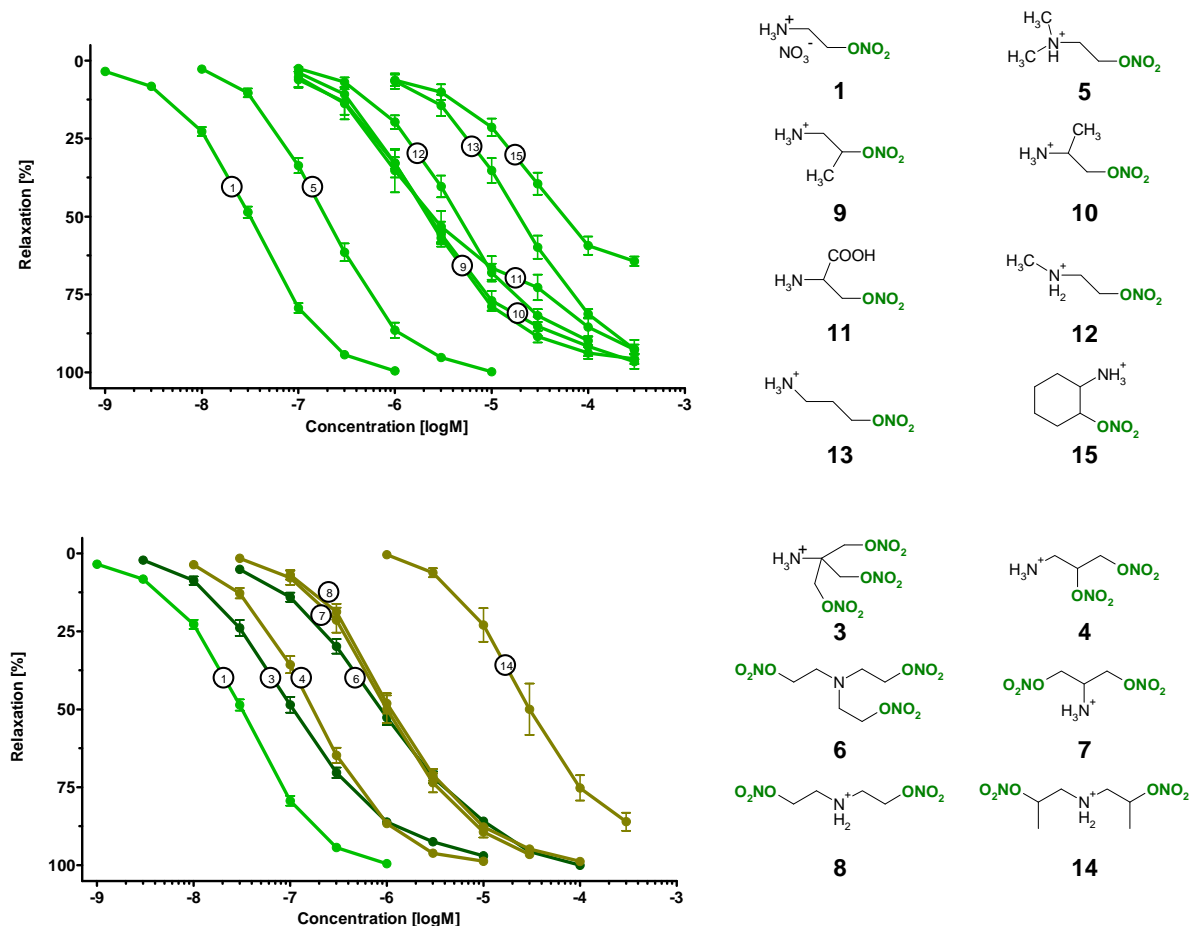


Abb. F-1: Konzentrations-Wirkungskurven an  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vokontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein (links) und Strukturen (rechts) 14 untersuchter Aminoalkylnitrate. Das Hydrochlorid von Verbindung 1 zeigt die gleiche Vasodilatation wie das Nitratsalz (nicht dargestellt). Oben: Aminoalkylmononitrate, unten: Aminoalkyloligonitrate und AEN. Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5-13 separaten Versuchen. ● = Mononitrate, ● = Dinitrate, ● = Trinitrate.

Im Hinblick auf Tachyphylaxie und Toleranzentwicklung brachten die Studien ebenfalls neue Erkenntnisse. Die Entstehung einer Tachyphylaxie hängt anscheinend nicht, wie früher angenommen, von der Potenz eines organischen Nitrats ab, sondern vielmehr von der Anzahl der im Molekül enthaltenen Nitratgruppen. Bisher enthielten stark wirksame Nitrate immer drei oder mehr Nitratfunktionen, so dass beide Eigenschaften nicht zu trennen waren. Es konnte jedoch für Aminoalkylnitrate gezeigt werden, dass hier hoch aktive Substanzen zum Teil frei von *in vitro* Toleranz sind, während schwächer wirksame Nitrate eine *in vitro* Toleranz verursachen. Ähnliches gilt für die Bioaktivierung, wie orientierende Versuche mit

dem ALDH-Inhibitor Benomyl ergaben. Auch besteht kein Zusammenhang zwischen der Wirkstärke eines organischen Nitrats und dem Bioaktivierungsweg (*Publikation 6, Kap. D.4*).

Die in Kooperation mit Prof. Daiber in Mainz durchgeführten Untersuchungen mit AEN und TEAN verdeutlichen ebenfalls die Heterogenität der Aminoalkylnitrate. Das Mononitrat AEN ist ein hochpotenter Vasodilatator, der *in vitro* keine Toleranz verursacht. *In vivo* wird die Wirkung bei wiederholter Gabe allerdings deutlich abgeschwächt. Eine Bioaktivierung über die ALDH-2 kann ausgeschlossen werden, wahrscheinlicher ist eine Beteiligung der Xanthinoxidoreduktase an der Aktivierung des Nitrats. Des Weiteren induziert AEN keinen vaskulären oxidativen Stress oder eine endotheliale Dysfunktion. TEAN hingegen ist für ein Trinitrat eher den schwach wirksamen Substanzen zuzuordnen. Trotzdem ruft es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine signifikante Tachyphylaxie hervor. Darüber hinaus fördert TEAN die Entstehung oxidativen Stresses und induziert damit in der Folge auch eine endotheliale Dysfunktion (*Publikation 4*).

Bei den Aminoalkylnitraten handelt es sich demzufolge um eine neue Wirkstoffklasse mit eigenen Regeln in Bezug auf Aktivität, Toleranzentwicklung und Bioaktivierung.

### ***Studien zur Nachhaltigkeit der Relaxation***

Erste Untersuchungen zur Erholung der Gefäße nach Applikation eines einmaligen Nitratbolus wiesen darauf hin, dass die Nachhaltigkeit der Relaxation von der Konzentration des zugegebenen Nitrats abhängig ist. Bei nahezu vollständiger Dilatation scheinen sich die Arterien langsamer zu erholen als nach Auslösung einer submaximalen Relaxation. Weiterführende Experimente mit zwei Verbindungen, die sich hinsichtlich ihrer Aktivität unterscheiden, können diesen Zusammenhang jedoch nicht bestätigen (*Kap. D.1*).

### ***Pharmakologische Charakterisierung der bioaktiven GTN-Metaboliten***

Erwartungsgemäß sinkt die Wirkstärke der GTN-Metaboliten mit abnehmender Anzahl der Nitratfunktionen im Molekül. Bei gleicher Anzahl von Nitratgruppen entscheidet die Stellung der Reste über die vasodilatatorische Potenz. Metaboliten mit endständigen Nitratgruppen sind demnach stärker wirksam als jene mit Nitratrest am zentralen Kohlenstoffatom. Diesen Abweichungen liegen möglicherweise unterschiedliche Affinitäten gegenüber den bioaktivierenden Systemen zugrunde (*Publikation 3*).

### ***Pharmakologische Charakterisierung von NO-Donor-Hybridmolekülen***

Bei den NO-Donor-Hybridverbindungen handelt es sich insgesamt um moderate Vasodilatoren. Die Vasoaktivität bleibt trotz der Hybridisierung in den Mononitrat-Verbindungen erhalten. Das Prodrug-artige NONOat-Hybrid wirkt im Vergleich zu den

organischen Nitraten verhältnismäßig schwach, was mit einer verlangsamten Freisetzung im *in vitro* Versuch erklärbar ist. Die Einführung einer zusätzlichen Nitratfunktion in das Molekül steigert bei den Statin-Hybridverbindungen weiter die Aktivität (*Publikation 2, Kap. D.2*).

### ***Untersuchungen zur Genexpression organischer Nitrate***

Die Expression des antioxidativ wirksamen Enzyms Hämoxxygenase-1 konnte während eines Forschungsaufenthaltes bei Prof. Dr. Kleinert in Mainz erfolgreich für verschiedene organische Nitrate untersucht werden. Ein Zusammenhang zwischen der Toleranzfreiheit der Verbindungen und der Genexpression konnte jedoch nicht bestätigt werden. Das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur Toleranz führende TEAN induziert als einziges Aminoalkylnitrat signifikant die HO-1-Expression. Im Gegensatz dazu steigert das *in vitro* zwar toleranzfreie, *in vivo* jedoch Toleranz hervorrufende AEN die Expression der für HO-1 kodierenden mRNA nicht (*Kap. D.3*).

## G Conclusion

In order to gain further insights into structure-activity relationships of nitrovasodilators, different organic nitrates were synthesized and studied with regard to vasoactivity, induction of tolerance, bioactivation and gene expression.

Related to the scientific issues of this thesis mentioned in *section B.2* the essential results of this dissertation are summarized subsequently.

### ***Investigations on structure-activity relationships of organic alkylnitrates***

Investigations of organic alkylnitrates resulted in a wide range of vasorelaxant potencies for the tested compounds. The activities varied from almost ineffective (compound 14) to equipotent to GTN (AEN, compound 1). A correlation between lipophilicity and vasoactivity, which was assumed so far, could not be observed. This marked discrepancy in the vasodilating potencies can be explained by different affinities towards the bioactivating enzymes. Besides, an active transport for AEN, which resembles biogenic amines, may also be relevant. Differences in vasoactivity of various organic nitrates cannot only be explained by the number of nitrate groups in the respective molecule. This correlation obviously merely exists when the nitrate carrier molecule does not contain any other functional groups just like in the clinically used compounds. In substituted derivatives, the carrier molecule plays an important role with respect to vasodilating potency.

### ***Synthesis of novel aminoalkylnitrates***

To study the influence of an additional aminogroup on the vasorelaxant potency of a nitrate molecule, 15 structurally different aminoalkylnitrates were synthesized. Those organic nitrate compounds were prepared by esterification of the corresponding aminoalcohols with fuming nitric acid in different solvents (*publication 6*).

### ***Structure-activity relationships of organic aminoalkylnitrates***

Aminoalkylnitrates were characterized as a novel class of nitrovasodilators. This could be shown in *in vitro* studies with 15 structurally different compounds. Neither the vasorelaxant potency nor *in vitro* tolerance follows any rules that have been established for clinically used organic nitrates. The tested mononitrates and oligonitrates exhibit a wide range of vasodilating activities similar to the mononitrates in *publication 1*. Thus, aminoalkylnitrates are not generally highly potent substances. Again, none of the studied nitrates were able to outperform AEN, even though the vasoactivity of oligonitrates was also tested in these investigations. As a consequence, the vasodilating potency does not only depend on the number of nitrate groups.

The results regarding tachyphylaxis and development of tolerance were not in agreement with previous findings. Development of tachyphylaxis did not depend on the potency of the organic nitrate, but on the number of nitrate groups. Based on the supposition that all nitrates with three or more nitrate moieties are highly active and all mono- and dinitrates are not, those properties could not be distinguished. It was shown that highly potent substances can be devoid of *in vitro* tolerance while low potent organic nitrates may induce *in vitro* tolerance. Orientating investigations using the ALDH-inhibitor benomyl led to similar results. No correlation of potency and bioactivation pathway was discovered but a dependence on the number of nitrate functions (*publication 6, chapter D.4*).

The investigations regarding AEN and TEAN, which were conducted in cooperation with Prof. Dr. Daiber, highlighted the heterogeneity of the aminoalkylnitrates. The mononitrate AEN is a highly active vasodilator, which is devoid of tolerance in organ bath studies. However, repeated application *in vivo* results in a significantly diminished effect. Bioactivation by ALDH-2 can be excluded, it is more likely that xanthinoxidoreductase is involved in the biotransformation. Furthermore, no induction of oxidative stress and endothelial dysfunction could be found. On the contrary, the trinitrate TEAN, actually belonging to the low potent organic nitrates, leads to significant tolerance both *in vitro* as well as *in vivo*. Moreover, TEAN enhances the genesis of oxidative stress and subsequently leads to endothelial dysfunction (*publication 4*).

In conclusion, aminoalkylnitrates represent a novel class of nitrovasodilators with own rules concerning vasorelaxant activity, tolerance and bioactivation.

### ***Investigations on the recovery of contraction***

Preliminary studies on the recovery of contraction after application of a single nitrate bolus indicated that the persistence of the relaxation correlates with the concentration of the given substance. Subsequent to an almost virtually complete dilation, the arteries seemed to recover more slowly than after provoking a submaximal relaxation. However, further studies with two distinctive compounds – regarding their activity – could not prove this relation.

### ***Pharmacological characterization of bioactive GTN-metabolites***

As expected, the potency of the GTN-metabolites decreases with reduced nitrate moieties in the molecule. For equal nitrate functions, their position determines the vasorelaxant activity. Metabolites with terminal nitrate groups in a chain-shaped molecule are more active than those with central nitrate moieties. Different affinities towards the bioactivating enzymes could be a possible explanation for this.



***Pharmacological characterization of NO-donor-hybrid molecules***

Generally, the tested NO-donor-hybrid molecules are moderate vasodilators. Despite hybridization, vasoactivity could be preserved in all studied mononitrates. Caused by the attenuated release in the *in vitro* studies, the prodrug-like NONOate-hybrid was low potent as compared to the organic nitrate compounds. Introduction of an additional nitrate group into a nitrate-statin-hybrid further increases the potency.

***Studies on gene expression of organic nitrates***

Expression of the antioxidant enzyme heme oxygenase-1 could be successfully investigated for different organic nitrates. A correlation between tolerance and gene expression could not be confirmed. TEAN, which causes tolerance both *in vitro* as well as *in vivo*, induces HO-1-expression exclusively in the group of the organic aminoalkylnitrates. *In vitro* but not *in vivo* tolerance-free AEN does not increase the expression of mRNA encoding for HO-1.



## H Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	$\beta$ -Amyloid
ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimersche Krankheit
ADP	Adenosindiphosphat
AEN	Aminoethylnitrat (2-Nitrooxyethylammoniumnitrat)
ALDH-2	mitochondriale Aldehyddehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	einsträngige, zu RNA komplementäre DNA
cGK-I	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COX-2	Cyclooxygenase-2
CYP 450	Cytochrom P450
DEAN	Diethylaminodinitrat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DETA-NO	Diethylentriamin-NONOat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
ED	endotheliale Dysfunktion
EDRF	endothelium derived relaxing factor
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fe[DECT] <sub>2</sub>	Eisen(II)-diethyldithiocarbamat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC/MS	Gaschromatograph mit nachgeschaltetem Massenspektrometer
GDN	Glyceroldinitrat
GMN	Glycerolmononitrat
GTN	Glyceroltrinitrat
GTP	Guanosintriphosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HO-1	Hämoxygenase-1
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbidmononitrat
LDL	Low Density Lipoprotein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid – oxidierte Form
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid – reduzierte Form

---

NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
ODQ	1 <i>H</i> -[1,2,4]Oxadiol[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-on
pD <sub>2</sub>	negativer dekadischer Logarithmus des EC <sub>50</sub> -Werts
PDE	Phosphodiesterase
PEdiN	Pentaerythritoldinitrat
PEmonoN	Pentaerythritolmononitrat
PETN	Pentaerythritoltetranitrat
PEtriN	Pentaerythritoltrinitrat
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PKC	Proteinkinase C
qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA-BP	mRNA bindende Proteine
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
SEM	Standard Error of Mean – Standardfehler
sGC	lösliche Guanylylcyclase
SIN-1	Linsodomin – aktiver Metabolit des Molsidomin
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
SOD	Superoxiddismutase
Sper-NO	Spermin-NONOat,
TAMRA oder TAM	Carboxytetramethylrhodamin
TEAN	Triethylaminotrinitrat
TF	Transkriptionsfaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VASP	Vasodilatator-Stimuliertes-Phosphoprotein

## I Literaturverzeichnis

1. Online: Statistisches Bundesamt Deutschland [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
2. Online: Dimdi, ICD-10-GM Version 2010  
<http://www.dimdi.de/static/de/klasi/diagnosen/icd10/htmlgm2010/index.htm>
3. Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 5. Auflage **1999**.
4. Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.; Starke, K. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie*, Elsevier Verlag, 9. Auflage **2009**.
5. Jawad, E.; Arora, R. Chronic stable angina pectoris. *Dis Mon* **2008**, 54, 671-689.
6. Mutschler, E. *Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 7. Auflage **1997**.
7. Lüllmann, H.; Mohr, K. *Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme Verlag, 14. Auflage **1999**.
8. Sobrero, A. Sur plusieurs composés détonants produits avec l'acide nitrique et de la dextrine, la mannite et la glycérine. *CR Acad Sci* **1847**, 25, 247-248.
9. Online: Ascanio Sobrero (1812-1888): Biographical Note  
[http://nobelprize.org/alfred\\_nobel/biographical/articles/life-work/sobrero.html](http://nobelprize.org/alfred_nobel/biographical/articles/life-work/sobrero.html)
10. Guthrie, F. Contributions to the knowledge of the amyl group. *J Chem Soc* **1879**, 11, 245-252.
11. Brunton, T. On the action of nitrite of amyl on the circulation. *J Anat Physiol* **1871**, 5, 92-101.
12. Brunton, T. On the use of nitrite of amyl in angina pectoris. *Lancet* **1867**, 90, 97-98.
13. Fye, W. B. Nitroglycerin: a homeopathic remedy. *Circulation* **1986**, 73, 21-29.
14. Hering, C. Glonoine, a new medicine for headache. *Am J Homoeopathy* **1849**, 4, 3.
15. Marsh, N.; Marsh, A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2000**, 27, 313-319.
16. Brunton, T. *Therapeutics of the circulation*, P. Blakiston's Son & Co. **1908**.
17. Smith, E.; Hart, F. D. William Murrell, physician and practical therapist. *Br Med J* **1971**, 3, 632-633.
18. Fye, W. B. Vasodilator therapy for angina pectoris: the intersection of homeopathy and scientific medicine. *J Hist Med Allied Sci* **1990**, 45, 317-340.
19. Carr, C.; Musser, R.; Schmidt, J.; Krantz, J. The fate of mannitol and mannitan in the animal body. *J Biol Chem* **1933**, 102, 721-732.
20. Carr, C.; Krantz, J. C., Jr. Sugar Alcohols XII: The fate of polygalitol and mannitol in the animal body. *J Biol Chem* **1938**, 124, 221-227.
21. Ellis, F.; Krantz, J. Sugar Alcohols XXII: Metabolism and toxicity studies with mannitol and sorbitol in man and animals. *J Biol Chem* **1941**, 141, 147-154.
22. Krantz, J. C., Jr.; Carr, C.; Forman, S.; Ellis, F. Alkyl Nitrites III: A pharmacologic study of a new series of organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* **1939**, 67, 187-190.
23. Goldberg, L. Pharmacological properties of sorbide dinitrate. *Acta Physiol Scand* **1948**, 15, 173-187.
24. Leslie, R. Nitroglycerin and isosorbide dinitrate in coronary insufficiency. *Tex State J Med* **1961**, 57, 432-434.

25. Fremont, R. Controlled observations on clinical efficacy of isosorbide dinitrate. *Geriatrics* **1961**, 16, 520-529.
26. MacKay, E. Isosorbide dinitrate in angina pectoris. An evaluation of sublingual and oral administration. *West J Med* **1961**, 2, 338-341.
27. Smith, A. S. Treatment of angina pectoris with a new coronary vasodilator, isosorbide dinitrate sublingual (Isordil Subloral). *Angiology* **1962**, 13, 425-434.
28. Needleman, P.; Krantz, J. C., Jr. The biotransformation of nitroglycerin. *Biochem Pharmacol* **1965**, 14, 1225-1230.
29. Dietz, A. J., Jr. The biotransformation of isosorbide dinitrate in dogs and humans. *Biochem Pharmacol* **1967**, 16, 2447-2448.
30. DiCarlo, F. J.; Crew, M. C.; Haynes, L. J.; Wilson, M. Pentaerythritol trinitrate metabolism by the rat. *Biochem Pharmacol* **1969**, 18, 1985-1990.
31. Needleman, P.; Lang, S.; Johnson, E. M., Jr. Organic nitrates: relationship between biotransformation and rational angina pectoris therapy. *J Pharmacol Exp Ther* **1972**, 181, 489-497.
32. Fung, H. L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of isosorbide dinitrate. *Am Heart J* **1985**, 110, 213-216.
33. Weitzman, D. Pentaerythritol tetranitrate in treatment of angina. *Br Med J* **1953**, 2, 1409-1412.
34. Perlman, A. A study of the therapeutic action and toxicity of pentaerythritol tetranitrate. *Angiology* **1952**, 3, 16-19.
35. Carr, C. J. History of the synthesis and pharmacology of isosorbide dinitrate. *Am Heart J* **1985**, 110, 197-201.
36. Pfeiffer, H. Effect of trinitrates upon human circulation. *Klin Wochenschr* **1950**, 28, 304-306.
37. Melville, K. I.; Lu, F. C. Cardiovascular effects of triethanolamine trinitrate- an experimental study. *Can Med Assoc J* **1951**, 65, 11-17.
38. Heller, E. M. Triethanolamine trinitrate (metamine) in the treatment of angina pectoris; a long-term study. *Can Med Assoc J* **1956**, 74, 197-204.
39. Russek, H. I.; Zohman, B. L.; Drumm, A. E.; Weingarten, W.; Dorset, V. J. Long-acting coronary vasodilator drugs: metamine, paveril, nitroglyn and peritrate. *Circulation* **1955**, 12, 169-175.
40. Riseman, J. E.; Altman, G. E.; Koretsky, S. Nitroglycerin and other nitrites in the treatment of angina pectoris; comparison of six preparations and four routes of administration. *Circulation* **1958**, 17, 22-39.
41. Fisch, S. Antianginal drugs. IV. The long-acting nitrates. *Am Heart J* **1966**, 71, 712-713.
42. Wimalawansa, S. J. Nitric oxide: novel therapy for osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* **2008**, 9, 3025-3044.
43. dos Reis, P. E.; Silveira, R. C.; Vasques, C. I.; de Carvalho, E. C. Pharmacological interventions to treat phlebitis: systematic review. *J Infus Nurs* **2009**, 32, 74-79.
44. de Heus, R.; Mulder, E. J.; Derks, J. B.; Visser, G. H. Acute tocolysis for uterine activity reduction in term labor: a review. *Obstet Gynecol Surv* **2008**, 63, 383-388.
45. Lehmann, G.; Hahnel, I.; Reiniger, G.; Lampen, M.; Beyerle, A.; Schomig, A. Infusions with molsidomine and isosorbide-5-mononitrate in congestive heart failure: mechanisms underlying attenuation of effects. *J Cardiovasc Pharmacol* **1998**, 31, 212-220.
46. Schwabe, U.; Paffrath, D. *Arzneiverordnungsreport 2009*, Springer Verlag **2009**; 589-596.

47. Bates, J. N.; Baker, M. T.; Guerra, R., Jr.; Harrison, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem Pharmacol* **1991**, *42 Suppl*, S157-S165.
48. Katsuki, S.; Arnold, W.; Mittal, C.; Murad, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* **1977**, *3*, 23-35.
49. Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **1980**, *288*, 373-376.
50. Ignarro, L. J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* **1989**, *65*, 1-21.
51. Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **1987**, *84*, 9265-9269.
52. Palmer, R. M.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **1987**, *327*, 524-526.
53. Online: The Nobel Foundation [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1998/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/)
54. Bradbury, J. Medicine Nobel Prize awarded to US pharmacologists. *Lancet* **1998**, *352*, 1287.
55. Korth, H. G.; Sustmann, R.; Thater, C.; Butler, A. R.; Ingold, K. U. On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of N-omega-hydroxyl-L-arginine to citrulline and nitric oxide. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 17776-17779.
56. Ziolo, M. T.; Bers, D. M. The real estate of NOS signaling: location, location, location. *Circ Res* **2003**, *92*, 1279-1281.
57. Das, S.; Kumar, K. N. Nitric oxide: its identity and role in blood pressure control. *Life Sci* **1995**, *57*, 1547-1556.
58. Murad, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Braz J Med Biol Res* **1999**, *32*, 1317-1327.
59. Friebe, A.; Koesling, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* **2003**, *93*, 96-105.
60. Bellamy, T. C.; Garthwaite, J. The receptor-like properties of nitric oxide-activated soluble guanylyl cyclase in intact cells. *Mol Cell Biochem* **2002**, *230*, 165-176.
61. Munzel, T.; Feil, R.; Mulsch, A.; Lohmann, S. M.; Hofmann, F.; Walter, U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation* **2003**, *108*, 2172-2183.
62. Brunner, F.; Schmidt, K.; Nielsen, E. B.; Mayer, B. Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* **1996**, *277*, 48-53.
63. Pagani, E. D.; VanAller, G. S.; O'Connor, B.; Silver, P. J. Reversal of nitroglycerin tolerance in vitro by the cGMP-phosphodiesterase inhibitor zaprinast. *Eur J Pharmacol* **1993**, *243*, 141-147.
64. Kurz, M. A.; Boyer, T. D.; Whalen, R.; Peterson, T. E.; Harrison, D. G. Nitroglycerin metabolism in vascular tissue: role of glutathione S-transferases and relationship between NO and NO<sub>2</sub>-formation. *Biochem J* **1993**, *292 (Pt 2)*, 545-550.
65. Thatcher, G. R.; Nicolescu, A. C.; Bennett, B. M.; Toader, V. Nitrates and NO release: contemporary aspects in biological and medicinal chemistry. *Free Radic Biol Med* **2004**, *37*, 1122-1143.
66. Chong, S.; Fung, H. L. Biochemical and pharmacological interactions between nitroglycerin and thiols. Effects of thiol structure on nitric oxide generation and tolerance reversal. *Biochem Pharmacol* **1991**, *42*, 1433-1439.

67. Noack, E.; Feelisch, M. Molecular mechanisms of nitrovasodilator bioactivation. *Basic Res Cardiol* **1991**, *86 Suppl 2*, 37-50.
68. Artz, J. D.; Toader, V.; Zavorin, S. I.; Bennett, B. M.; Thatcher, G. R. In vitro activation of soluble guanylyl cyclase and nitric oxide release: a comparison of NO donors and NO mimetics. *Biochemistry* **2001**, *40*, 9256-9264.
69. Artz, J. D.; Schmidt, B.; McCracken, J. L.; Marletta, M. A. Effects of nitroglycerin on soluble guanylate cyclase: implications for nitrate tolerance. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 18253-18256.
70. Gorren, A. C.; Russwurm, M.; Kollau, A.; Koesling, D.; Schmidt, K.; Mayer, B. Effects of nitroglycerin/L-cysteine on soluble guanylate cyclase: evidence for an activation/inactivation equilibrium controlled by nitric oxide binding and haem oxidation. *Biochem J* **2005**, *390*, 625-631.
71. Marks, G. S.; McLaughlin, B. E.; Nakatsu, K.; Brien, J. F. Direct evidence for nitric oxide formation from glyceryl trinitrate during incubation with intact bovine pulmonary artery. *Can J Physiol Pharmacol* **1992**, *70*, 308-311.
72. Feelisch, M.; Kelm, M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, *180*, 286-293.
73. Mulsch, A.; Bara, A.; Mordvintcev, P.; Vanin, A.; Busse, R. Specificity of different organic nitrates to elicit NO formation in rabbit vascular tissues and organs in vivo. *Br J Pharmacol* **1995**, *116*, 2743-2749.
74. Kleschyov, A. L.; Oelze, M.; Daiber, A.; Huang, Y.; Mollnau, H.; Schulz, E.; Sydow, K.; Fichtlscherer, B.; Mulsch, A.; Munzel, T. Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ Res* **2003**, *93*, 104-112.
75. Nunez, C.; Victor, V. M.; Tur, R.; Alvarez-Barrientos, A.; Moncada, S.; Esplugues, J. V.; D'Ocon, P. Discrepancies between nitroglycerin and NO-releasing drugs on mitochondrial oxygen consumption, vasoactivity, and the release of NO. *Circ Res* **2005**, *97*, 1063-1069.
76. Oelze, M.; Mollnau, H.; Hoffmann, N.; Warnholtz, A.; Bodenschatz, M.; Smolenski, A.; Walter, U.; Skatchkov, M.; Meinertz, T.; Munzel, T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res* **2000**, *87*, 999-1005.
77. Fung, H. L. Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: is this old mystery solved? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2004**, *44*, 67-85.
78. Chen, Z.; Zhang, J.; Stamler, J. S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, *99*, 8306-8311.
79. Chen, Z.; Foster, M. W.; Zhang, J.; Mao, L.; Rockman, H. A.; Kawamoto, T.; Kitagawa, K.; Nakayama, K. I.; Hess, D. T.; Stamler, J. S. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**, *102*, 12159-12164.
80. Daiber, A.; Oelze, M.; Coldewey, M.; Bachschmid, M.; Wenzel, P.; Sydow, K.; Wendt, M.; Kleschyov, A. L.; Stalleicken, D.; Ullrich, V.; Mulsch, A.; Munzel, T. Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol* **2004**, *66*, 1372-1382.
81. Sydow, K.; Daiber, A.; Oelze, M.; Chen, Z.; August, M.; Wendt, M.; Ullrich, V.; Mulsch, A.; Schulz, E.; Keaney, J. F., Jr.; Stamler, J. S.; Munzel, T. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* **2004**, *113*, 482-489.
82. Mackenzie, I. S.; Maki-Petaja, K. M.; McEniery, C. M.; Bao, Y. P.; Wallace, S. M.; Cheriyan, J.; Monteith, S.; Brown, M. J.; Wilkinson, I. B. Aldehyde dehydrogenase 2 plays a role in the bioactivation of nitroglycerin in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2005**, *25*, 1891-1895.
83. Li, Y.; Zhang, D.; Jin, W.; Shao, C.; Yan, P.; Xu, C.; Sheng, H.; Liu, Y.; Yu, J.; Xie, Y.; Zhao, Y.; Lu, D.; Nebert, D. W.; Harrison, D. C.; Huang, W.; Jin, L. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. *J Clin Invest* **2006**, *116*, 506-511.



84. Kollau, A.; Hofer, A.; Russwurm, M.; Koesling, D.; Keung, W. M.; Schmidt, K.; Brunner, F.; Mayer, B. Contribution of aldehyde dehydrogenase to mitochondrial bioactivation of nitroglycerin: evidence for the activation of purified soluble guanylate cyclase through direct formation of nitric oxide. *Biochem J* **2005**, *385*, 769-777.
85. Munzel, T.; Daiber, A.; Mulsch, A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res* **2005**, *97*, 618-628.
86. Ignarro, L. J.; Lippton, H.; Edwards, J. C.; Baricos, W. H.; Hyman, A. L.; Kadowitz, P. J.; Gruetter, C. A. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* **1981**, *218*, 739-749.
87. Li, H.; Cui, H.; Liu, X.; Zweier, J. L. Xanthine oxidase catalyzes anaerobic transformation of organic nitrates to nitric oxide and nitrosothiols: characterization of this mechanism and the link between organic nitrate and guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 16594-16600.
88. Cosby, K.; Partovi, K. S.; Crawford, J. H.; Patel, R. P.; Reiter, C. D.; Martyr, S.; Yang, B. K.; Wacławski, M. A.; Zalos, G.; Xu, X.; Huang, K. T.; Shields, H.; Kim-Shapiro, D. B.; Schechter, A. N.; Cannon, R. O., III; Gladwin, M. T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* **2003**, *9*, 1498-1505.
89. Shiva, S.; Huang, Z.; Grubina, R.; Sun, J.; Ringwood, L. A.; MacArthur, P. H.; Xu, X.; Murphy, E.; Darley-Usmar, V. M.; Gladwin, M. T. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ Res* **2007**, *100*, 654-661.
90. Kozlov, A. V.; Staniek, K.; Nohl, H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* **1999**, *454*, 127-130.
91. Castello, P. R.; David, P. S.; McClure, T.; Crook, Z.; Poyton, R. O. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab* **2006**, *3*, 277-287.
92. Butler, A. R.; Ridd, J. H. Formation of nitric oxide from nitrous acid in ischemic tissue and skin. *Nitric Oxide* **2004**, *10*, 20-24.
93. Mann, C. J.; Weiner, H. Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. *Protein Sci* **1999**, *8*, 1922-1929.
94. Online: RCSB Protein Data Base <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1O05>
95. Chen, Z.; Stamler, J. S. Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends Cardiovasc Med* **2006**, *16*, 259-265.
96. Mukerjee, N.; Pietruszko, R. Inactivation of human aldehyde dehydrogenase by isosorbide dinitrate. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 21664-21669.
97. Beretta, M.; Sottler, A.; Schmidt, K.; Mayer, B.; Gorren, A. C. Partially irreversible inactivation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by nitroglycerin. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 30735-30744.
98. Wenzel, P.; Hink, U.; Oelze, M.; Schuppan, S.; Schaeuble, K.; Schildknecht, S.; Ho, K. K.; Weiner, H.; Bachschmid, M.; Munzel, T.; Daiber, A. Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity. Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 792-799.
99. Needleman, P.; Hunter, F. E., Jr. Effects of organic nitrates on mitochondrial respiration and swelling: possible correlations with the mechanism of pharmacologic action. *Mol Pharmacol* **1966**, *2*, 134-143.
100. Feelisch, M.; Noack, E.; Schroder, H. Explanation of the discrepancy between the degree of organic nitrate decomposition, nitrite formation and guanylate cyclase stimulation. *Eur Heart J* **1988**, *9 Suppl A*, 57-62.
101. Bennett, B. M.; McDonald, B. J.; St James, M. J. Hepatic cytochrome P-450-mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate. *J Pharmacol Exp Ther* **1992**, *261*, 716-723.

102. Minamiyama, Y.; Takemura, S.; Akiyama, T.; Imaoka, S.; Inoue, M.; Funae, Y.; Okada, S. Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels. *FEBS Lett* **1999**, *452*, 165-169.
103. Minamiyama, Y.; Takemura, S.; Nishino, Y.; Okada, S. Organic nitrate tolerance is induced by degradation of some cytochrome P450 isoforms. *Redox Rep* **2002**, *7*, 339-342.
104. Daiber, A.; Wenzel, P.; Oelze, M.; Munzel, T. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clin Res Cardiol* **2008**, *97*, 12-20.
105. Schwemmer, M.; Bassenge, E. New approaches to overcome tolerance to nitrates. *Cardiovasc Drugs Ther* **2003**, *17*, 159-173.
106. Thadani, U. Nitrate tolerance, rebound, and their clinical relevance in stable angina pectoris, unstable angina, and heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* **1997**, *10*, 735-742.
107. Needleman, P.; Johnson, E. M., Jr. Mechanism of tolerance development to organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* **1973**, *184*, 709-715.
108. Munzel, T.; Sayegh, H.; Freeman, B. A.; Tarpey, M. M.; Harrison, D. G. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* **1995**, *95*, 187-194.
109. Beckman, J. S.; Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **1996**, *271*, C1424-C1437.
110. Schulz, E.; Tsilimingas, N.; Rinze, R.; Reiter, B.; Wendt, M.; Oelze, M.; Woelken-Weckmuller, S.; Walter, U.; Reichenspurner, H.; Meinertz, T.; Munzel, T. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation* **2002**, *105*, 1170-1175.
111. Laursen, J. B.; Somers, M.; Kurz, S.; McCann, L.; Warnholtz, A.; Freeman, B. A.; Tarpey, M.; Fukai, T.; Harrison, D. G. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* **2001**, *103*, 1282-1288.
112. Daiber, A.; Oelze, M.; Sulyok, S.; Coldewey, M.; Schulz, E.; Treiber, N.; Hink, U.; Mulsch, A.; Scharffetter-Kochanek, K.; Munzel, T. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase in mice (Mn-SOD<sup>+/-</sup>): a novel approach to assess the role of oxidative stress for the development of nitrate tolerance. *Mol Pharmacol* **2005**, *68*, 579-588.
113. Jurt, U.; Gori, T.; Ravandi, A.; Babaei, S.; Zeman, P.; Parker, J. D. Differential effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on the development of tolerance and evidence of lipid peroxidation: a human in vivo study. *J Am Coll Cardiol* **2001**, *38*, 854-859.
114. Hacker, A.; Muller, S.; Meyer, W.; Kojda, G. The nitric oxide donor pentaerythritol tetranitrate can preserve endothelial function in established atherosclerosis. *Br J Pharmacol* **2001**, *132*, 1707-1714.
115. Oberle, S.; Abate, A.; Grosser, N.; Vreman, H. J.; Dennerly, P. A.; Schneider, H. T.; Stalleicken, D.; Schroder, H. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythrityl trinitrate. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, *290*, 1539-1544.
116. Dulak, J.; Deshane, J.; Jozkowicz, A.; Agarwal, A. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation* **2008**, *117*, 231-241.
117. Wenzel, P.; Oelze, M.; Coldewey, M.; Hortmann, M.; Seeling, A.; Hink, U.; Mollnau, H.; Stalleicken, D.; Weiner, H.; Lehmann, J.; Li, H.; Forstermann, U.; Munzel, T.; Daiber, A. Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2007**, *27*, 1729-1735.
118. Pfeilschifter, J.; Beck, K. F. Nitric Oxide and Gene Expression. In *Nitric Oxide, Cell Signaling, and Gene Expression*. Cadenas, E.; Lamas, S. (Eds.), Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA **2005**, 327-348.
119. Thum, T.; Bauersachs, J. Microarray-based gene expression profiling to elucidate cellular responses to nitric oxide--a review from an analytical and biomedical point of view. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, *851*, 3-11.

120. Suwattanasophon, C.; Phansuwan-Pujito, P.; Srikiatkachorn, A. 5-HT(1B/1D) serotonin receptor agonist attenuates nitroglycerin-evoked nitric oxide synthase expression in trigeminal pathway. *Cephalalgia* **2003**, *23*, 825-832.
121. Tassorelli, C.; Greco, R.; Armentero, M. T.; Blandini, F.; Sandrini, G.; Nappi, G. A role for brain cyclooxygenase-2 and prostaglandin-E2 in migraine: effects of nitroglycerin. *Int Rev Neurobiol* **2007**, *82*, 373-382.
122. Wang, E. Q.; Lee, W. I.; Brazeau, D.; Fung, H. L. cDNA microarray analysis of vascular gene expression after nitric oxide donor infusions in rats: implications for nitrate tolerance mechanisms. *AAPS Pharm Sci* **2002**, *4*, E10.
123. Oberle, S.; Schwartz, P.; Abate, A.; Schroder, H. The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythrityl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *261*, 28-34.
124. Dragoni, S.; Gori, T.; Lisi, M.; Di Stolfo, G.; Pautz, A.; Kleinert, H.; Parker, J. D. Pentaerythrityl tetranitrate and nitroglycerin, but not isosorbide mononitrate, prevent endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2007**, *27*, 1955-1959.
125. Kuwano, Y.; Rabinovic, A.; Srikantan, S.; Gorospe, M.; Demple, B. Analysis of nitric oxide-stabilized mRNAs in human fibroblasts reveals HuR-dependent heme oxygenase 1 upregulation. *Mol Cell Biol* **2009**, *29*, 2622-2635.
126. Kleinert, H., *Persönliche Mitteilung* **2010**
127. Pautz, A.; Rauschkolb, P.; Schmidt, N.; Art, J.; Oelze, M.; Wenzel, P.; Forstermann, U.; Daiber, A.; Kleinert, H. Effects of nitroglycerin or pentaerythrityl tetranitrate treatment on the gene expression in rat hearts: evidence for cardiotoxic and cardioprotective effects. *Physiol Genomics* **2009**, *38*, 176-185.
128. Wenzel, P.; Hink, U.; Oelze, M.; Seeling, A.; Isse, T.; Bruns, K.; Steinhoff, L.; Brandt, M.; Kleschyov, A. L.; Schulz, E.; Lange, K.; Weiner, H.; Lehmann, J.; Lackner, K. J.; Kawamoto, T.; Munzel, T.; Daiber, A. Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: a proof of concept study in ALDH-2<sup>-/-</sup> mice. *Br J Pharmacol* **2007**, *150*, 526-533.
129. Abuo-Rahma, G. D.; Horstmann, A.; Radwan, M. F.; El Emam, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. NO-donors, part 9 : diazeniumdiolates inhibit human platelet aggregation and induce a transient vasodilatation of porcine pulmonary arteries in accordance with the NO-releasing rates. *Eur J Med Chem* **2005**, *40*, 281-287.
130. Koenig, A.; Lange, K.; Konter, J.; Daiber, A.; Stalleicken, D.; Glusa, E.; Lehmann, J. Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythrityl tetranitrate. *J Cardiovasc Pharmacol* **2007**, *50*, 68-74.
131. Kandiah, N.; Feldman, H. H. Therapeutic potential of statins in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **2009**, *283*, 230-234.
132. Maron, D. J.; Fazio, S.; Linton, M. F. Current perspectives on statins. *Circulation* **2000**, *101*, 207-213.
133. Lahera, V.; Goicoechea, M.; de Vinuesa, S. G.; Miana, M.; de las, H. N.; Cachofeiro, V.; Luno, J. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem* **2007**, *14*, 243-248.
134. Jick, H.; Zornberg, G. L.; Jick, S. S.; Seshadri, S.; Drachman, D. A. Statins and the risk of dementia. *Lancet* **2000**, *356*, 1627-1631.
135. Ostrowski, S. M.; Wilkinson, B. L.; Golde, T. E.; Landreth, G. Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 26832-26844.
136. Thatcher, G. R.; Bennett, B. M.; Reynolds, J. N. NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **2006**, *3*, 237-245.
137. Mollnau, H.; Wenzel, P.; Oelze, M.; Treiber, N.; Pautz, A.; Schulz, E.; Schuhmacher, S.; Reifenberg, K.; Stalleicken, D.; Scharffetter-Kochanek, K.; Kleinert, H.; Munzel, T.; Daiber, A. Mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance--comparison of nitroglycerin and pentaerythrityl tetranitrate in Mn-SOD<sup>+/+</sup>-mice. *BMC Cardiovasc Disord* **2006**, *6*, 44.

138. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **1987**, *162*, 156-159.
139. Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402-408.
140. Lange, K. NO-Donor-Hybridverbindungen und andere Derivate des Flurbiprofens als potentielle Alzheimer-Therapeutika. *Dissertation (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät)* **2008**.
141. Weber, W.; Michaelis, K.; Luckow, V.; Kuntze, U.; Stalleicken, D. Pharmacokinetics and bioavailability of pentaerithrityl tetranitrate and two of its metabolites. *Arzneimittelforschung*. **1995**, *45*, 781-784.
142. Capellos C.; Fisco, W. J.; Ribaud, C.; Hogan, V. D.; Campisi, J.; Murphy, F. X.; Rosenblatt, D. H. Basic hydrolysis of glycerol nitrate esters. I. 1-Glyceryl and 2-glyceryl nitrate esters. *Int J Chem Kinet* **1982**, *14*, 903-917.
143. Capellos C.; Fisco, W. J.; Ribaud, C.; Hogan, V. D.; Campisi, J.; Murphy, F. X.; Castorina, T. C.; Rosenblatt, D. H. Basic hydrolysis of glyceryl nitrate esters. II. 1,2-glyceryl and 1,3-glyceryl dinitrate esters. *Int J Chem Kinet* **1984**, *16*, 1009-1026.
144. Behnisch, R. Salpetersäureester. In *Houben-Weyl, Band E16c, Organische Stickstoffverbindungen III*. Kleemann, D. (Ed.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1992**, 23-66.
145. Afza, N.; Malik, A.; Latif, F.; Voelter, W. Synthesis of sugar nitrates by nucleophilic substitution. *Liebigs Ann Chem* **1985**, *1985*, 1929-1934.
146. Hakimelahi, G. H.; Sharghi, H.; Zarrinmayeh, H.; Khalafi-Nezhad, A. The synthesis and application of novel nitrating and nitrosating agents. *Helv Chim Acta* **1984**, *67*, 906-915.
147. Barbière, J. Estérification nitrique et nitration d'amino-alcools. *Bull Soc Chim Fr* **1944**, *11*, 470-480.
148. Romanova, L. B.; Ivanovo, M. E.; Nesterenko, D. A.; Eremenko, L. T. Synthesis of nitroxyalkylammonium nitrates. *Russ Chem Bull* **1994**, *43*, 1207-1208.
149. Bovet, D.; Bovet-Nitti, F. Propriétés hypotensives et vasodilatatrices de l'ester nitrique de l'aminoéthanol et de ses dérivés. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **1947**, *73*, 367-385.
150. Daiber, A.; Munzel, T. Characterization of the antioxidant properties of pentaerithrityl tetranitrate (PETN)-induction of the intrinsic antioxidative system heme oxygenase-1 (HO-1). *Methods Mol Biol* **2010**, *594*, 311-326.
151. Decker, M.; Koenig, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. Synthesis and vasorelaxant properties of hybrid molecules out of NO-donors and the beta-receptor blocking drug propranolol. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, *14*, 4995-4997.
152. Lange, K. NO-Donor-Hybridverbindungen und andere Derivate des Flurbiprofens als potentielle Alzheimer-Therapeutika. *Dissertation (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät)* **2008**.
153. Konter, J.; Mollmann, U.; Lehmann, J. NO-donors. Part 17: Synthesis and antimicrobial activity of novel ketoconazole-NO-donor hybrid compounds. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 8294-8300.

## **J     Anhang**

### **Curriculum vitae**

#### **CAROLIN JULIANE ROEGLER**

Geburtsdatum:        02. Januar 1978

Geburtsort:            Bonn

Familienstand:        ledig

#### **Schulbildung:**

08/1984 – 06/1988    Grundschule: Schloßbachschule Bonn

08/1988 – 06/1994    Carl-von-Ossietzky Gymnasium, Bonn

08/1994 – 06/1997    Ernst-Moritz-Arndt Gymnasium, Bonn (Abitur)

#### **Hochschulbildung:**

10/1997 – 10/2001    Studium der Pharmazie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn

#### **Arbeitserfahrung:**

1997 – 2000            In den Semesterferien Werkstudentin bei der Bayer AG Leverkusen, Entwicklung von Polyurethanschäumen

11/2001 – 04/2002    Ahorn Apotheke, Bonn (Praktisches Jahr)

05/2002 – 10/2002    Heide Markt Apotheke, München (Praktisches Jahr)

12/2002                Pharmazeutische Prüfung (Approbation als Apothekerin 02/2003)

10/2003 – 10/2006    Schloß Apotheke, Ismaning bei München  
Angestellte Apothekerin in Vollzeit

#### **Wissenschaftliche Tätigkeiten:**

02/2003 – 09/2003    Diplomarbeit an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn im Arbeitskreis von Prof. Dr. Christa Müller zum Thema „Dimerisierungsreaktionen von 5,6-Diaminouracil-Derivaten durch reduktive C-C-Verknüpfung“

02/2003 – 09/2003    Wissenschaftliche Hilfskraft an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Institut für Pharmazie

Seit 10/2006            Doktorandin im Arbeitskreis von Prof. Dr. Jochen Lehmann, Bearbeitung des Themas „Organische Aminoalkylnitrate – Eine neue Klasse NO-basierter Vasodilatoren“

Seit 10/2006            Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Pharmazie

## Publikationsverzeichnis

### *Manuskripte*

Koenig, A.; Roegler, C.; Lange, K.; Daiber, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 5881-5885.

Fang, L.; Appenroth, D.; Decker, M.; Kiehntopf, M.; Roegler, C.; Deufel, T.; Fleck, C.; Peng, S.; Zhang, Y.; Lehmann, J. Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-Alzheimer drug candidates. *J Med Chem* **2008**, *51*, 713-716.

Lange, K.; Koenig, A.; Roegler, C.; Seeling, A.; Lehmann, J. NO donors. Part 18: Bioactive metabolites of GTN and PETN - synthesis and vasorelaxant properties. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 3141-3144.

Schuhmacher, S.; Schulz, E.; Oelze, M.; Konig, A.; Roegler, C.; Lange, K.; Sydow, L.; Kawamoto, T.; Wenzel, P.; Munzel, T.; Lehmann, J.; Daiber, A. A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena. *Br J Pharmacol* **2009**, *158*, 510-520.

Roegler, C.; Lehmann, J. Medizinische Chemie der Organischen Nitrate und PDE5-Hemmer. *Pharm Unserer Zeit* **2010**, *39* (5), 351-358.

Roegler, C.; Koenig, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. A Novel Class of Nitrovasodilators - Potency and *in Vitro* Tolerance of Organic Aminoalkylnitrates. *J Cardiovasc Pharmacol* **2010**, akzeptiert am 15.07.2010

Müller, C.E., Roegler, C., Hockemeyer, J. 5,5'-Bipyridyl-2,4,6,2',4',6'-hexaone derivatives (hydurilic acids): syntheses, mechanism of C-C-bond formation and properties of the dimeric barbituric acid derivatives. *Heterocycles* **2009**, *79*, 703-720.

**Vorträge**

Von Alkylnitrat zu Aminoalkylnitrat – Erneut Zeit umzudenken?

Roegler, C.; König, A.; Daiber, A.; Lehmann, J.

Mainz, **2008**

Aminoalkylnitrate – Eine neue Klasse von Nitraten?

Roegler, C.; König, A.; Daiber, A.; Lehmann, J.

Jena, **2009**

**Poster**

Structure-vasodilator activity relationships of organic aminoalkyl nitrates

Roegler, C.; Koenig, A.; Glusa, E.; Lehmann, J.

Erlangen, **2007**

A lovastatin-derived nitrate-symvastatin hybrid

Lengfelder, C.; Roegler, C.; Abouzid, K.; Lehmann, J.

Bonn, **2008**

Organic Aminoalkyl nitrates - A novel class of nitric oxide-based vasodilators?

Roegler, C.; König, A.; Daiber, A.; Glusa, E.; Lehmann, J.

Jena, **2009**

**Tagungen**

10/2006	DPhG Jahrestagung	Marburg
07/2007	Minisymposium PETN	Würzburg
10/2007	DPhG Jahrestagung	Erlangen
10/2007	PETN-Expertentreffen	Eisenach
06/2008	Minisymposium PETN	Mainz
10/2008	DPhG Jahrestagung	Bonn
08/2009	Minisymposium PETN	Jena
09/2009	DPhG Jahrestagung	Jena

**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit habe ich selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt.

Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen im Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation an Dritte erbracht.

Die vorliegende Dissertation habe ich ausschließlich an der Friedrich-Schiller-Universität als Prüfungsarbeit eingereicht.

Jena, 15. September 2010